

**ZUR ROLLE DER CHINONE IN ATMUNG
UND GÄRUNG IN ESCHERICHIA
COLI K12**

Horst Schaefer

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553809_0007

Aus dem
Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. T. Bücher
Prof. Dr. M. Klingenberg
Prof. Dr. H. G. Zachau

ZUR ROLLE DER CHINONE IN ATMUNG UND GÄRUNG IN ESCHERICHIA
COLI K12

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Horst Schaefer

aus Hannover

München 1973

Tag der mündlichen Prüfung : 7.8.1973

1. Berichterstatter PD Dr. rer. nat. A. Kröger
2. Berichterstatter Prof. Dr. rer. nat. O. Kandler

TU-DRUCK GmbH, 8 München 2,
Gabelsbergerstraße 19, Tel. 2809095



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. Mai 1971 bis 1. Mai 1973 am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie unter der Anleitung von Herrn PD Dr. rer. nat. Achim Kröger durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	4
II. METHODEN	6
II.1. Präparative Methoden	6
II.1.1. Zucht der Bakterien	6
II.1.2. Präparationen partikulärer Membran- fraktionen	8
II.1.3. Extraktion und Reinkorporation von Ubichinon und Menachinon	10
II.2. Analytische Methoden	13
II.2.1. Bestimmung von Chinongehalten und enzymatischen Aktivitäten	13
II.2.2. Bestimmung von Substraten	14
II.2.3. Proteinbestimmung	16
III. ERGEBNISSE	17
III.1. Chinongehalte in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen	17
III.1.1. Aerobe Zucht von E. coli K12 auf ver- schiedenen Kohlenstoffquellen	17
III.1.2. Anaerobe Zucht von E. coli K12 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	19
III.2. Lokalisation der Chinone	24
III.2.1. Vergleich verschiedener Zellauf- schlußverfahren	24
III.2.2. Fraktionierung eines Lysozymauf- schlusses	27
III.3. Elektronentransport in Abhängigkeit von den Chinonen	30
III.3.1. Elektronentransport in aerob gezoge- nem E. coli K12	30

	Seite
III.3.2. Elektronentransport in anaerob gezogenem E. coli K12	33
III.4. Redoxverhalten der Chinone	36
III.4.1. Die Chinone im Fließgleichgewicht der Atmung und der Fumaratreduktion	36
III.4.2. Differenzspektren der Chinone	40
III.5. Die Cytochrome	42
III.5.1. Redoxverhalten der b- Cytochrome	42
III.5.2. Differenzspektren der Cytochrome	44
III.6. Die Übertragung der Elektronen auf Fumarat	46
III.6.1. Kinetische Unterscheidung zwischen Fumaratreduktase und Succinatdehydrogenase	46
III.6.2. Verteilung von Fumaratreduktase und Succinatdehydrogenase auf die Fraktionen bei verschiedenen Zellaufschlüssen	48
III.7. Die Funktion der Fumaratreduktion im anaeroben Stoffwechsel von E. coli K12	53
III.7.1. Die Stöchiometrie der wachstumsunterhaltenden Reaktion bei anaerober Zucht auf D,L- Laktat und Fumarat	53
III.7.2. Der molare Wachstumsertrag Y_{Acetat} beim anaeroben Wachstum von E. coli K12 auf D,L- Laktat und Fumarat	56
III.7.3. Der molare Wachstumsertrag Y_{Acetat} bei anaerober Zucht von E. coli K12 auf Pyruvat	57
IV. DISKUSSION	59
IV. 1. Die Funktion von Ubichinon	59
IV.2. Die Funktion von Menachinon	61
V. ZUSAMMENFASSUNG	65

	Seite
VI. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	67
VII. LITERATURVERZEICHNIS	68

I. EINLEITUNG

Die Atmungskette der Mitochondrien von den Einzellern bis zu den höchstorganisierten Vielzellern ist in Funktion und Ausstattung mit den Komponenten des Elektronentransports relativ gleichartig aufgebaut. Ihrer Aufgabe, der Oxidation des im Citratcyclus gebildeten Wasserstoffs durch molekularen Sauerstoff, entspricht die Ausrüstung mit Ubichinon und gleichartigen Dehydrogenasen und Cytochromen. Im Gegensatz dazu enthalten die Bakterien eine Vielzahl weitgehend anderer Cytochrome und entweder Ubichinon oder Menachinon allein oder beide Chinone (1). Die mitochondrialen wie die bakteriellen Atmungsketten sind mit der Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung verknüpft (2,3).

Die größere Vielfalt der Elektronentransportkomponenten in den Bakterien gegenüber den Mitochondrien scheint mit der größeren Vielfalt ihrer Funktionen eng verbunden zu sein. So werden Substrate wie Laktat, Malat, Glycero- 1 -Phosphat und Formiat durch membrangebundene Flavoproteine dehydriert und neben Sauerstoff auch Akzeptoren wie Nitrat und Fumarat verwendet (4,5,6).

Die Funktion der Chinone, soweit sie allein in einem Bakterium vorkommen, ist die von Elektronenüberträgern von den Dehydrogenasen auf die Cytochrome. Da die Chinone nicht in der Membran fixiert sind (7), sondern in der Lipidphase der Plasmamembran diffundieren, ist eine Zweiteilung der Elektronentransportketten in Dehydrogenasen auf der einen Seite und in Cytochromketten auf der anderen Seite der Chinone anzunehmen. Diese Zweiteilung ist auch aus den stöchiometrischen Verhältnissen der Gehalte zu fordern, in welchem die Dehydrogenasen einerseits und die Cytochrome andererseits in der Membran vorkommen und die eine getrennte Ausbildung und Differenzierung beider Systeme ermöglicht (8). So lassen sich durch geeignete Wachstumsbedingungen die membrangebundenen Dehydrogenasen der Bakterien in Art und Konzentration erheblich variieren, ohne daß dadurch die Ausrüstung mit Cytochromen erheblich beeinflußt wird (9). Durch wieder andere

Wachstumsbedingungen ist es möglich, daß die Dehydrogenasen in Art und Konzentration konstant gehalten werden, während die Cytochrome variiert werden (10).

Die Funktion der Chinone in Bakterien, welche beide Chinone enthalten wie z. B. *E. coli*, ist umstritten.

Kashket und Brodie (11,12) kamen zu dem Ergebnis, daß Ubichinon im Weg der Oxidation von Succinat und Menachinon im Weg der NADH- Oxidation beteiligt ist. Sie forderten weiter, daß die beiden Chinone in getrennten Membranabschnitten lokalisiert sind.

Cox et al. (13) schlossen aus Experimenten mit Ubichinonmangelmутanten von *E. coli*, daß Ubichinon nicht im Hauptweg des Elektronentransports zum Sauerstoff beteiligt ist, sondern auf einem Nebenweg liegt.

Newton et al. (14) fanden, daß Menachinon im Anaeroben an der Oxidation von Dihydroorotat durch Fumarat beteiligt ist und keine größere Rolle im Elektronentransport zum Sauerstoff spielt. Weil die Oxidation des Dihydroorotats für die Synthese von Uracil notwendig ist, besteht die Rolle des Menachinons nach Auffassung dieser Autoren in erster Linie darin, im Baustoffwechsel, nicht jedoch im Energiehaushalt mitzuwirken.

Kröger et al. (5) fanden für *Proteus rettgeri*, daß Ubichinon eine essentielle Komponente für den Elektronentransport zum Sauerstoff ist und daß Menachinon für die Reduktion von Fumarat durch NADH und Formiat notwendig ist. In aerob und anaerob gezogenem *P. rettgeri* stimulierte reinkorporiertes Menachinon die Atmung mit NADH und Formiat, was auf eine Beteiligung dieses Chinons in der Atmung hinweist.

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle von Ubichinon und Menachinon in den Elektronentransportwegen zum Sauerstoff und zum Fumarat an *E. coli* K12 untersucht.

II. METHODEN

II.1. Präparative Methoden

II.1.1. Zucht der Bakterien

II.1.1.1. Stammkulturen

Stammkulturen von *E. coli* K12 Hfr AB (Stamm 411-7/8, Hygieneinstitut Marburg) wurden auf Tryptic Soy Agar (Difco, Detroit, USA) gehalten und alle zwei Monate auf neue Platten übertragen.

II.1.1.2. Vorkulturen

Vorkulturen wurden in ca. 10 ml 2 % Proteose Peptone (Difco Nr. 3) und 0.6 % NaCl in einem unbewegten Reagenzglas gezogen. Das Medium wurde vor dem Sterilisieren mit 1 M Tris auf pH 7.6 gebracht.

II.1.1.3. Anaerobe Zucht in Gegenwart von Thioglycolat

Für die strikt anaerobe Zucht auf definierten Kohlenstoffquellen wurde das Mineralmedium nach Davis und Mingoli (15) übernommen, mit der Veränderung, daß Ammonsulfat in doppelter Konzentration eingesetzt wurde. In 1-Liter-Meßkolben mit Magnetrührkern wurde ein Konzentrat der gewünschten Kohlenstoffquelle aus steriler Lösung pipettiert und die Meßkolben mit Mineralmedium auf ca. 750 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 21 ml 1 M Tris und 1.3 ml Thioglycolsäure (Roth) zugesetzt und bis zur Eichmarke mit Mineralmedium aufgefüllt. Die verschlossenen Meßkolben wurden 48 Stunden bei Zimmertemperatur unter Rühren inkubiert. Das pH des Mediums war nach dieser Inkubation 7.6. Kontrollansätze mit einer Spur Methylenblau zeigten, daß die Reduktion des Farbstoffs und damit auch des Sauerstoffs nach Ab-

lauf dieser Zeit vollständig war. Die anaeroben Medien wurden mit 1 ml einer auf komplexem Medium (II.1.1.2.) wachsenden Vorkultur inokuliert.

II.1.1.4. Anaerobe Zucht ohne Thioglycolat

Für die anaerobe Zucht auf Laktat und Fumarat bei den Extraktions- und Reinkorporationsversuchen wurde ein Mineralmedium verwendet, welches in 1 Liter 2.5 g NaCl, 1 g $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ sowie einen Tropfen Spurenelemente gemäß Bartsch et al. (16) enthielt. D,L- Laktat (Merck) und Dinatriumfumarat (Boehringer) wurden 100 mM vorgegeben und das pH des Mediums mit 1 M Tris auf 7.1 eingestellt. Durch das frisch autoklavierte Medium wurde nach der Beimpfung mit 10 ml der Vorkultur 5 min steriler Stickstoff geleitet. Der Stickstoff wurde zur Entfernung des vorhandenen Sauerstoffs vor dem Sterilfilter durch ein mit BTS- Katalysator (BASF) gefülltes U- Rohr geleitet, welches auf ca. 150°C erhitzt war.

Für die anaerobe Zucht auf Laktat und Fumarat oder auf Pyruvat bei den Bilanzen wurde ein Mineralmedium verwendet, welches 2.5 g/l NaCl, 0.5 g/l $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ sowie 0,5 mM NaHCO_3 und 0.25 ml Spurenelemente (16) enthielt. Zu 0.2 l dieser Lösung wurden 50 mM D,L- Milchsäure (Merck) und 50 mM Dinatriumfumarat (Boehringer) gegeben. Das Medium wurde mit Tris auf pH 6.5 gebracht und durch ein Sterilfilter (Seitz EF 6/03) in eine sterile Gaswaschflasche mit Magnetührkern gedrückt. Nach der Inokulation mit 5 ml der Vorkultur wurde 5 min lang steriler Stickstoff unter Rühren durch den Waschflaschenaufsatz geperlt. Bei der anaeroben Zucht auf Pyruvat wurde genauso verfahren, außer daß 50 mM Natriumpyruvat (Boehringer) statt Milchsäure und Fumarat zugegeben wurde. Der pH- Wert wurde bei der Zucht auf Pyruvat mit Tris auf pH 7.6 eingestellt.

II.1.1.5. Aerobe Zucht

Vermindert aerobe Kulturen wurden auf komplexem Medium ge-

zogen, welches die gleiche Zusammensetzung besaß wie das für die Vorkulturen verwendete Medium. 250 ml- Mengen des Mediums wurden nach dem Beimpfen mit 1 ml der Vorkultur in Fernbachkolben geschüttelt.

Extrem aerobe Kulturen wurden in einem 7 l- Glasfermenter (Chemap, Männedorf Schweiz, Modell GF 0007) bei einem Luftdurchfluß von 12 l/min und einer Rührgeschwindigkeit von 2 500 Umdrehungen/ min gezogen.

II.1.1.6. Temperatur

Die Zuchttemperatur betrug in allen Fällen 36°C.

II.1.2. Präparationen partikulärer Membranfraktionen

II.1.2.1. Partikuläre Fraktion aus Ampicillinsphäroplasten

Zu einer definierten Menge einer exponentiell auf komplexem Medium wachsenden Kultur wurde eine Lösung aus 2 M Sucrose und 0.4 % Proteose Peptone gegeben, bis die Endkonzentration an Sucrose 0.5 M war. Nach 2 Stunden weiteren Wachstums wurden 0.2 g/l Ampicillin zugesetzt und die Ausbildung von Sphäroplasten alle halbe Stunde im Mikroskop verfolgt. Vier Stunden nach der Ampicillinzugabe wurde die Kultur geerntet, in einem geringen Volumen 0.5 M Sucrose aufgenommen und in ein zehnfach so großes Volumen Wasser eingerührt. Das Lysat wurde 15 min bei 7 500 x g zentrifugiert und das Sediment verworfen. Der Überstand wurde 30 min bei 40 000 x g zentrifugiert. Das Sediment (= partikuläre Fraktion) wurde in 0.5 M Sucrose aufgenommen.

II.1.2.2. Partikuläre Membranfraktion aus Lysozymsphäroplasten

Frisch geerntete Bakterien wurden in 0.5 M Sucrose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 so aufgenommen, daß eine 1 : 10- Verdünnung dieses Inkubationsgemisches bei 576 nm in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke eine Transmission zwischen 30 und 36 % ergab. Zu dem Inkubationsgemisch wurden 100 mg/ml Lysozym

hinzugegeben und unter leichtem Rühren 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die entstandenen Sphäroplasten wurden abzentrifugiert, in einem geringen Volumen 0.5 M Sucrose, 100 mM Tris- Acetat pH 7.3 aufgenommen und in einem mindestens 10-fachen Volumen Wasser lysiert. Das Lysat wurde mit 20 μ g/ml DNase I (Koch- Light- Laboratories Ltd., Colnbrook, England) zwei Stunden bei Zimmertemperatur und 14 weitere Stunden bei 0°C unter leichtem Rühren inkubiert. Intakte Bakterien wurden aus dem Lysat durch 15 min Zentrifugation bei 1 250 x g sedimentiert und die partikuläre Membranfraktion durch 20 min lange Zentrifugation bei 40 000 x g abgetrennt.

II.1.2.3. Schallhomogenate und Schallpartikel

Die Herstellung von Schallhomogenaten wurde an die vor- ausgegangenen Zuchtbedingungen angepaßt. Aerob gezogene Bakterien wurden in 0.25 M Sucrose suspendiert und 4 x 5 sec bei 0 - 3°C in 1.5 ml- Mengen beschallt. Anaerob gezogene Bakterien wurden dagegen in 0.5 M Sucrose aufgenommen und nur 3 x 5 sec lang beschallt. Zum Beschallen wurde ein Branson Sonifier Modell No. J17V (Danburry, USA) verwendet.

Zur Herstellung von Schallpartikeln durch Zentrifugation wurden Schallhomogenate, welche nach der oben angeführten Weise hergestellt worden waren, 60 min lang bei 140 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0.5 M Sucrose aufgenommen.

Zur Herstellung von Schallpartikeln durch Ammonsulfatfällung wurde ein bestimmtes Aliquot eines Schallhomogenats auf das mindestens sechsfache seines Volumens mit Wasser verdünnt. In dieses Volumen wurde unter vorsichtigem Rühren soviel festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gegeben, bis die Sättigung 30 % betrug. Das Gemisch wurde 30 min unter leichtem Rühren bei 0°C inkubiert und das Präzipitat anschließend durch 30 min lange Zentrifugation bei 40 000 x g zu einem festen Sediment konzentriert. Der Überstand wurde abgegossen, das Sediment sorgfältig abgetropft und in 0.5 M Sucrose aufgenommen. Ein Nachwaschen des Sediments muß vermieden werden, da sonst ein Teil der Fumaratreduktase ausgewaschen wird.

II.1.3. Extraktion und Reinkorporation von Ubichinon und Menachinon

Für die Präparation von lyophilisierten, extrahierten und reinkorporierten Partikeln wurde die Methode nach Ernster et al. (17) angewendet.

II.1.3.1. Extraktion und Reinkorporation der Chinone an durch Lysozymaufschluß präparierten Partikeln

II.1.3.1.a Gefriertrocknung

Die partikuläre Fraktion von Lysozymaufschlüssen wurde auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml in 0.15 M KCl suspendiert und bei -60°C und 10^{-2} Torr 30 Stunden lang lyophilisiert.

II.1.3.1.b Extraktion

100 mg des gepulverten gefriergetrockneten Materials wurden in einem 100 ml- Meßkolben mit Magnetrührer mit 70 ml über Natrium getrocknetem Pentan versetzt. Der Meßkolben wurde fest verstopft und die Suspension 12 Stunden lang bei 0°C gerührt. Die extrahierten Partikel wurden in Schliffgläsern bei 2 000 x g in 6 ml- Mengen abzentrifugiert und am Rotationsverdampfer eine Stunde lang bei Zimmertemperatur unter Vakuum getrocknet.

II.1.3.1.c Reinkorporation

Zur Reinkorporation wurden je 30 mg der extrahierten Partikel mit jeweils 1 ml einer Chinonlösung versetzt. Die Konzentration an Q- 9 war in diesen Lösungen 2 mM, die Konzentration an MK- 7 0.8 mM; das Lösungsmittel war Pentan. Die in den Chinonlösungen suspendierten Partikel wurden 60 min bei 0°C in verschlossenen Schliffgläsern energisch geschüttelt. Anschließend wurden die Chinonlösungen abzentrifugiert

wie bei der Extraktion und die Sedimente aus den reinkorporierten Partikeln vorsichtig mit wenig Pentan überspült. Die erneute Abzentrifugation des nachgespülten Pentans und die Trocknung der reinkorporierten Partikel erfolgte wie bei den extrahierten Partikeln.

Lyophilisierte, extrahierte und reinkorporierte Partikel wurden wie die ursprünglichen Partikel in 0.5 M Sucrose aufgenommen.

II.1.3.2. Extraktion und Reinkorporation der Chinone an durch Ultraschall und Ammonsulfatfällung präparierten Partikeln

II.1.3.2.a Gefriertrocknung

Das Präzipitat eines mit Ammonsulfat bei 30 % Sättigung versetzten Schallhomogenats wurde durch 30 min Zentrifugation bei 40 000 x g konzentriert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die Sedimente sorgfältig abgetropft und in 0.15 M KCl pH 7.1 in einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml aufgenommen. Das homogenisierte Material wurde in 2 ml-Mengen 24 Stunden bei -60°C und 10^{-2} Torr lyophilisiert.

II.1.3.2.b Extraktion

100 mg der gepulverten gefriergetrockneten Partikel wurden 10 mal bei 0°C mit jeweils 5 ml über Natrium getrockneten Pentans extrahiert. Zur Extraktion wurden die Partikel in Schliffgläsern mit einem passenden Teflonkolben homogenisiert. Durch jeweils 2 min Zentrifugation bei 2 000 x g wurden die Partikel sedimentiert und der Überstand abgegossen. Nach Abschluß der Extraktion wurden die Partikel am Rotationsverdampfer eine Stunde lang bei Zimmertemperatur unter Vakuum getrocknet.

II.1.3.2.c Reinkorporation

Die Reinkorporation von Q- 9 und MK- 7 in die extrahierten Partikel erfolgte wie unter II.1.3.1.c angegeben.

II.2. Analytische Methoden

II.2.1. Bestimmung von Chinongehalten und enzymatischen Aktivitäten

II.2.1.1. Chinongehalte

Die Chinone wurden nach Kröger et al. (5) in Extrakten reduziert durch Zugabe von Natriumborhydrid. Die Extinktionsänderungen wurden bei verschiedenen Wellenlängenpaaren registriert und mit den Differenzextinktionskoeffizienten die Gehalte an Chinon bestimmt.

Bei 280 - 289 nm ist $\Delta \epsilon$ reduziert - oxidiert für Q = $- 8.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für MK = $- 3.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;
bei 248 - 253.6 nm ist $\Delta \epsilon$ reduziert - oxidiert für Q = $2.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ und für MK = $22.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

II.2.1.2. Atmungsaktivitäten

Die Atmungsaktivitäten wurden an einer Clark- Sauerstoffelektrode bestimmt; der Puffer war 50 mM Phosphat pH 7.6. Die Temperatur betrug bei den Bestimmungen der Atmungsaktivität 25°C.

II.2.1.3. Dehydrogenaseaktivitäten

Die Aktivität der Dehydrogenasen wurde anhand der Reduktion von Methylenblau optisch verfolgt. Ausgewertet wurden diejenigen Aktivitäten, welche die Dehydrogenasen im Anaeroben besaßen. Die Küvette wurde anaerob gemacht, indem Stickstoff vorsichtig durchgeperlt wurde. Wenn die Aktivität der Dehydrogenasen gering war und die Küvette trotz des durchgeperlten Stickstoffs nicht anaerob wurde, wurde ein Glucoseoxidase-Katalase- System angewendet. Dazu wurde die zu untersuchende Fraktion mit 2 mM Glucose, 10 μl einer Glucoseoxidaselösung (GOD, Boehringer) und 5 μl Katalase (Boehringer) in Gegen-

wart von Methylenblau versetzt. Der Puffer war in allen Aktivitätsmessungen 50 mM Phosphat pH 7.6.

II.2.1.4. Fumaratreduzierende Aktivität

Zur Bestimmung der fumaratreduzierenden Aktivität mit reduziertem Benzylviologen wurden die Proben in einer verschließbaren Küvette in Gegenwart von Fumarat anaerob suspendiert und der reduzierte Farbstoff mit einer Spritze injiziert. Die Reduktion des Fumarats wurde bei 578 nm verfolgt ($\epsilon = 9.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Benzylviologen wurde in 0.5 M Phosphat- Puffer pH 7.6 in Gegenwart von Palladium- Tierkohle mit Wasserstoff reduziert. Wenn die Reduktion vollständig war, wurde das Biuretglass, in welchem die Reduktion durchgeführt wurde, mit Isooktan überschichtet und blasenfrei verstopft und der Katalysator durch 5 min Zentrifugation bei 7 000 x g abgetrennt.

Zur Bestimmung der fumaratreduzierenden Aktivität mit natürlichen Substraten wurden die Fraktionen in 0.5 M Sucrose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 suspendiert. Die Reduktion des Fumarats mit NADH wurde bei 366 nm verfolgt, die Reduktion mit Formiat und D- Laktat am Zweiwellenlängenphotometer bei 265 - 289 nm ($\Delta\epsilon = 0.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

II.2.2. Bestimmung von Substraten

II.2.2.1. Probenentnahme aus anaerob wachsenden Kulturen

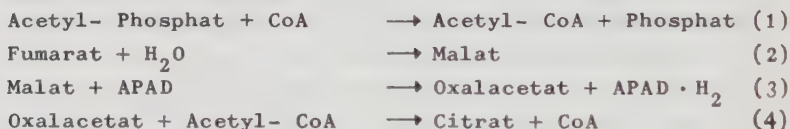
Den anaerob auf Laktat und Fumarat oder Pyruvat wachsenden Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, indem nachgereinigter steriler Stickstoff durch den Waschflaschenaufsatz auf die Kulturen gedrückt wurde. Die aus dem Steigrohr austretende Probe wurde in einem 1 ml- Reaktionsgefäß (Eppendorf) abgefangen. Die Proben wurden 2 min bei 3 000 x g abzentrifugiert und 1 ml des Überstandes mit 0.2 ml 1 M Perchlorsäure versetzt. In diesen angesäuerten Proben wurden Acetat, Fumarat, Succinat sowie Pyruvat, D- und L- Laktat und Formiat bestimmt.

II.2.2.2. Bestimmung von Acetat

Acetat wurde gaschromatographisch als Essigsäure mit einer FFAP- Säule und Flammenionisationsdetektor bestimmt. Dazu wurden 3 μ l der Probe auf die Säule gespritzt und die Fläche des elektrischen Signals gemessen. Mit einer Essigsäureeichlösung, deren Gehalt acidimetrisch bestimmt worden war, wurde aus der Fläche die Konzentration an Acetat ermittelt.

II.2.2.3. Bestimmung von Fumarat

Fumarat wurde im gekoppelten enzymatischen Test nach Schoner (18) mit Acetylpyridindinucleotid (APAD) bei 366 nm gemessen. Die Extinktion des reduzierten APAD ($\epsilon = 9.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) ist nach folgender Reaktionssequenz der Konzentration an Fumarat proportional:



0.5 ml 0.1 M Tris- Acetat- Puffer pH 7.4 wurden mit 20 μ l der verdünnten Probe versetzt und mit

- 5 μ l APAD 25 mM
- 5 μ l einer frischen Acetylphosphatlösung (10 mg/ml)
- 5 μ l einer frischen CoA- Lösung (5 mg/ml)
- 5 μ l Phosphotransacetylase (0.1 mg/ml)
- 5 μ l Citratsynthase (1 mg/ml)
- 5 μ l Fumarase (0.2 mg/ml).

Die Reaktion wurde mit 5 μ l Malatdehydrogenase (0.5 mg/ml) gestartet. In diesem Test werden Fumarat und Malat gemeinsam erfaßt.

II.2.2.4. Bestimmung von Succinat

Succinat wurde nach Singer et al. (19) mit Succinatdehydrogenase und Hexacyanoferrat im optisch enzymatischen Test bei 436 nm bestimmt:



Die Succinatkonzentration ist der Abnahme an Hexacyanoferrat ($\epsilon = 0.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) proportional.

Succinatdehydrogenase wurde aus Schweineherzen nach Bernath et al. (20) präpariert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

II.2.2.5. Bestimmung von D- Laktat und L- Laktat

D- Laktat wurde nach Gawehn et al. (21) mit D- Laktatdehydrogenase im optisch enzymatischen Test bestimmt.

L- Laktat wurde ebenfalls optisch enzymatisch mit L- Laktatdehydrogenase nach Hohorst (22) bestimmt.

II.2.2.6. Bestimmung von Formiat

Zur Bestimmung von Formiat wurde ein Aliquot der Probe in Gegenwart von 10 mM Malonat mit 5 μ l eines Schallhomogenats aus *Proteus rettgeri* an der Sauerstoffelektrode versetzt. *P. rettgeri* war zu diesem Zweck auf komplexem Medium gezogen, geerntet und beschallt worden. Die Abnahme an Sauerstoff nach Zugabe des Schallhomogenats ist der Menge an Formiat proportional.

II.2.2.7. Bestimmung von Pyruvat

Pyruvat wurde mit L- Laktatdehydrogenase in einer nach Czok et al. (23) modifizierten Weise bestimmt.

II.2.3. Proteinbestimmung

Proteingehalte wurden mit der Biuretmethode unter Verwendung von festem Kaliumcyanid bestimmt. (24)

III. ERGEBNISSE

III.1. Chinongehalte in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen

Die Gehalte an Ubichinon und Menachinon in Schallhomogenaten aus *E. coli* K12 hängen weitgehend davon ab, welche Zuchtbedingungen angewendet werden. So ist das Verhältnis der Gehalte an Ubichinon und Menachinon einmal vom Sauerstoffangebot während des Wachstums der Bakterien abhängig. Zum zweiten können aber auch die Substrate, auf denen die Bakterien gezogen werden, dieses Verhältnis beeinflussen.

III.1.1. Aerobe Zucht von *E. coli* K12 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Im Versuch von Tabelle 1 wurde *E. coli* bei optimaler Sauerstoffversorgung einmal auf Glucose, zum anderen auf komplexem Medium als Energiequelle gezogen. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurden die Bakterien in der stationären Phase des Wachstums geerntet und beschallt. In den Schallhomogenaten wurden die Chinongehalte, die Atmungsaktivitäten und die Aktivität der NADH-Fumaratreduktase gemessen.

Bei der Zucht auf Glucose ist etwa viermal mehr Ubichinon als Menachinon vorhanden und bei der Zucht auf komplexem Medium etwa zehnmal mehr.

In Gegenwart von CO_2 ist beim Wachstum auf Glucose oder komplexem Medium der Gehalt an Ubichinon etwa genauso groß wie der Gehalt an Menachinon. Ob das CO_2 als Gas oder in Form von Bicarbonat vorgegeben wird, hat auf die Ausbildung dieses Chinonverhältnisses von etwa 1 : 1 keinen Einfluß. Weiter wird bei der Zucht in Gegenwart von CO_2 neben den Atmungsaktivitäten mit NADH, Formiat, Succinat und D,L-Laktat als Substrat auch eine Oxidation von NADH durch Fumarat gefunden.

Nummer des Versuchs	Kohlenstoff- quelle	Chinongehalt (μ Mol/g Prot.) Q	Atmungsaktivität (μ Atom O/g Prot./min) NADH	Atmungsaktivität For Succ D,L-Lac (μ Atom O/g Prot./min) NADH	Fumaratreduktion (μ Mol/g Prot./min) NADH			
1	Glucose 0.2 %	1.09	0.27	168	183	20	10	0
2	Glucose 0.2 % + CO ₂ (95% O ₂ + 5% CO ₂)	0.35	0.32	9	-	-	-	7
3	Komplex	1.20	0.09	546	300	61	58	0
4	Komplex + 50 mM Pumarat	1.50	0.14	404	654	67	53	0
5	Komplex + 300 mM NaHCO ₃	0.56	0.63	504	392	248	50	26

Tabelle 1. Elektronentransportkomponenten in Schallhomogenaten aus aerob gezogenem E. coli K12

E. coli K12 wurde in 5 l- Ansätzen in einem 7 l- Glasfermenter gezogen wie unter Methoden beschrieben. (II.1.1.5.). In den Versuchen 1 - 4 war die Rührgeschwindigkeit 2 500 Umdrehungen/min, der Luftstrom 12 l/min. In Versuch 5 wurde Natriumhydrogencarbonat 0.3 M vorgegeben; der Luftstrom betrug nur 2 l/min, um gelöstes Kohlendioxid nicht zu schnell aus der wässrigen Phase zu verdrängen. Die Rührgeschwindigkeit war in Versuch 5 unverändert. In Versuch 2 wurde anstelle von Luft ein Gasgemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ durchgeblasen.

III.1.2. Anaerobe Zucht von E. coli K12 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

1 1- Ansätze aus Mineralmedium und der jeweiligen Kohlenstoffquelle wurden mit 1.5 mM neutralisierter Thioglycol-säure anaerob gemacht (Methoden II.1.1.3.) und die Bakterien bis zur stationären Phase gezogen. In Schallhomogenaten wurden die Chinongehalte sowie einige enzymatische Aktivitäten bestimmt. Da die Atmungsaktivitäten unter diesen Zuchtbedingungen sehr klein sind, wurden in den Versuchen 4, 5 und 6 der Tabelle 2 die Dehydrogenaseaktivitäten mit Methylenblau ermittelt.

Bei der Zucht von E. coli in einem Thioglycolsäuresystem sind die Atmungsaktivitäten wie auch die Dehydrogenaseaktivitäten mit NADH recht gering (Tabelle 2).

Wenn am Anfang des Elektronentransports zum Fumarat bereits die Dehydrogenasen eine geringe Aktivität besitzen, dann ist nicht zu erwarten, daß die Fumaratreduktion, welche mit Sicherheit noch einige weitere Elektronentransportkomponenten benötigt, mit einer höheren Geschwindigkeit abläuft als die primäre Dehydrierung. Das ist einer der Gründe, warum in den Versuchen 1 - 3 keine Reduktion des Fumarats durch NADH gefunden wurde.

In den Versuchen 4 - 6 wurde deshalb die fumaratreduzierende Aktivität unter Umgehung der Dehydrogenasen mit reduziertem Benzylviologen gemessen. Dieser Farbstoff reduziert das Fumarat mit höherer Aktivität als ein natürlicher Donor.

Der Versuch 2 zeigt, daß die Zugabe von Fumarat zu Glucose als Kohlenstoffquelle keine höheren Gehalte an Menachinon induziert, als sie ohne Fumarat vorhanden sind. Das selbe Ergebnis wird mit Malat erhalten (nicht gezeigt). Auch bei der Kombination von komplexem Medium mit Fumarat steigen die Gehalte an Menachinon nicht an. Sie sind genauso hoch wie bei der Zucht auf Glucose (nicht gezeigt).

Nummer des Versuchs	Kohlenstoff- quelle	Chinongehalt (μ Mol/g Prot.)	Atmungsaktivität (μ Atom O/g Prot./min)	Dehydrogenasenaktivität (μ Mol Methylenblau/ g Prot./min)	Fumaratreduktion (μ Mol Fumarat/ g Prot./min)
		Q	MK	NADH For Succ D, L-Lac	NADH Benzyl - viologen

1	Glucose 0.2 %	0.27	0.14	73	77	9	11		0	
2	Glucose 0.2 %+									
	50 mM Fumarat	0.24	0.10	47	7	9	6		0	
3	Glucose 0.2 %+									
	Komplex	0.22	0.12	5	15	0	0		0	
4	50 mM Pyruvat	1.67	4.02					51	103	~
5	50 mM D, L-Lak- tat + 50 mM Fumarat	0.93	3.82					17	173	42
									41	461
6	50 mM D-Laktat + 50 mM Fuma- rat	1.12	2.40					38	25	30
									15	177

Tabelle 2. Elektronentransportkomponenten in Schallhomogenaten aus anaerob gezogenem E. coli K12

Mit neutralisierter Thioglycolsäure anaerob gemachte 1 l-Meßkolben wurden mit E. coli K12 inokuliert und die Bakterien bis zur stationären Phase gezogen. Die Inokulation erfolgte erst, wenn in Kontrollansätzen eine Spur Methylenblau reduziert war. (Methoden, II.1.1.3.)

In den Versuchen 5 und 6 ist Fumarat mit Laktat kombiniert, da *E. coli* K12 anaerob weder auf Laktat noch auf Fumarat allein wächst (25). Wie der noch höhere Gehalt an Menachinon im Versuch 4 beim Wachstum auf Pyruvat zeigt, hat auch beim Wachstum auf Laktat und Fumarat das letztgenannte Substrat keinen Einfluß auf die Ausbildung des Menachinons. Hohe Menachinongehalte lassen sich durch Zugabe von Fumarat zum Medium nicht induzieren.

Ein Vergleich der Menachinongehalte in den Versuchen 1 - 6 der Tabelle 2 ergibt, daß viel Menachinon/ g Protein erst dann vorhanden ist, wenn das Bakterium anaerob auf einer physiologischen C_3 - Verbindung gezogen wird. Bei der anaeroben Zucht auf Glucose oder komplexem Medium wird dagegen weniger Menachinon/ g Protein gebildet.

Die einzige Ausnahme, bei welcher hohe Menachinongehalte auch bei der anaeroben Zucht auf Glucose erzielt werden, ergibt sich, wenn Bicarbonat in Substratkonzentrationen zugegen ist. In der Versuchsreihe zur Tabelle 3 wurden die Bakterien anaerob in Gegenwart von neutralisiertem Thioglycolat auf 0.2 % Glucose gezogen; definierte Mengen an Bicarbonat waren jeweils vorgelegt.

Vorgelegte Konzentration an NaHCO_3 (mM)	Chinongehalt ($\mu\text{Mol/g Prot.}$)	Fumaratreduktion mit Benzylviologen ($\mu\text{Mol Fumarat/g Prot.}/\text{min}$)
	Q	MK
0	0.51	0.20
25	0.80	0.69
50	0.65	0.83
75	0.69	1.74
100	0.69	2.24
		27
		40
		93
		133
		189

Tabelle 3. Chinongehalte und fumaratreduzierende Aktivität in Schallhomogenaten aus *E. coli* K12 nach anaero-
ber Zucht auf Glucose und Natriumhydrogencarbonat.

E. coli K12 wurde anaerob in Gegenwart von neutralisierter Thio-
glycolsäure gezogen wie unter Methoden beschrieben. Um vergleich-
bare Bedingungen zu erhalten, wurden die Kulturen in der sta-
tionären Phase des Wachstums geerntet.

Der Gehalt an Menachinon ist eng mit der fumaratreduzierenden Aktivität verbunden. Mit der Zunahme des Gehalts an Menachinon ist eine Zunahme des Gehalts an Fumaratreduktase verbunden. Die Gehalte an Ubichinon bleiben dagegen im Rahmen der natürlichen Schwankungsbreite konstant.

Um auszuschließen, daß dieses Ergebnis durch verschieden schnelles Wachstum der Bakterien zustande kommt, wurden die Wachstumskurven zum Experiment von Tabelle 3 aufgenommen. Es ergab sich, daß CO_2 zwar die verzögerte Phase des Wachstums verkürzt, die Wachstumsgeschwindigkeit $d(\log \text{ mg Trockengewicht}/dt)$ mit und ohne CO_2 dagegen dieselbe ist.

Höhere Bicarbonatkonzentrationen als 0.1 M ergeben keine Erhöhung des Gehalts an Menachinon mehr und auch die Fumaratreduktaseaktivität steigt nicht mehr an. Eine Wiederholung des Experiments von Tabelle 3 mit *Proteus rettgeri* ergab, daß dieses Bakterium auch ohne CO_2 bereits 2 μMol Menachinon/g Protein bildet und die Anwesenheit von Bicarbonat während des Wachstums die Menge an Menachinon nicht erhöht (nicht gezeigt).

III.2. Lokalisation der Chinone

III.2.1. Vergleich verschiedener Zellaufschlußverfahren

Bei der Zugabe von Ampicillin, einem Penicillinderivat, zu einer wachsenden Kultur von *E. coli* entstehen Sphäroplasten. Diese sind in 0.5 M Sucrose stabil und lassen sich mit den intakten Bakterien bei 40 000 x g abzentrifugieren. Bei der Übertragung in reines Wasser werden die Sphäroplasten osmotisch gechockt und lysieren, während die intakten Bakterien nicht platzen. Durch geeignete Zentrifugationen lassen sich die intakten Bakterien aus dem Lysat abtrennen und die lysierten Sphäroplasten als partikuläre Fraktion konzentrieren.

Eine andere Methode zur Herstellung von Sphäroplasten besteht darin, daß zu frisch geernteten Zellen Lysozym gegeben wird. Das Enzym daubt die Bakterienzellwand an, was zur Ausbildung von Sphäroplasten führt. Diese lassen sich genau wie die Ampicillinsphäroplasten lysieren und zu einer partikulären Membranfraktion konzentrieren.

Zu den Methoden, welche die intermediäre Ausbildung von Sphäroplasten umgehen, gehört der Zellaufschluß mit Ultraschall. Aus den Schallhomogenaten läßt sich wahlweise durch Ammonsulfatfällung oder durch Zentrifugation bei 120 000 - 140 000 x g eine partikuläre Fraktion gewinnen.

In der Tabelle 4 sind drei verschiedene Arten des Zellaufschlusses wiedergegeben. Ein Vergleich zwischen den Homogenaten und den partikulären Fraktionen zeigt, wie sehr die einzelnen Elektronentransportkomponenten in den partikulären Fraktionen gegenüber den Homogenaten angereichert sind. Aus dem Vergleich der Anreicherung der Chinone mit der Anreicherung anderer Elektronentransportkomponenten läßt sich ableiten, mit welchen anderen Elektronentransportkomponenten die Chinone assoziiert sind.

Der Gehalt an Ubichinon und Menachinon ist in den partikulären Fraktionen beim Zellaufschluß nach der Ampicillin- und der Lysozymmethode etwa viermal größer als im Schallhomo-

Aufschlußmethode	Fraktion	Chinongehalt (μ Mol/g Prot.)	Gehalt an b- Cytochromen (ml/g Prot./cm)	Atmungsaktivität (μ Atom O/g Prot./min)
		Q	MK	NADH For Succ D, L-Lac
Ampicillin + os- motischer Schock	Sphäropla- stenhomoge- nat partikuläre Fraktion	0.63	0.80	186 221 44 18
		2.60	3.30	655 597 52 23
		4.1	4.1	3.5 2.7 1.2 1.3
Lysozym + os- motischer Schock	Schallhomo- genat partikuläre Fraktion	0.82	0.40	580 533 117 93
		4.02	1.49	1180 1070 314 280
		4.9	3.7	2.1 2.0 2.7 3.0
Ultraschall + Ammonsulfat- fällung	Schallhomo- genat partikuläre Fraktion	0.56	0.41	148 450 99 71
		0.56	0.50	242 818 174 73
		1.0	1.2	1.6 1.8 1.8 1.0

TABELLE 4. Legende siehe Seite 26

Tabelle 4. Verteilung von Elektronentransportkomponenten nach Zellaufschluß mit verschiedenen Methoden.

E. coli K12 wurde vermindert aerob auf komplexem Medium gezogen. Die Präparation der partikulären Fraktion nach der Ampicillinmethode ist unter Methoden, II.1.2.1, die Präparation der partikulären Fraktion mit der Lysozymmethode ist unter II.1.2.2. beschrieben. Unter Methoden II.1.2.3. ist die Herstellung der Schallhomogenate sowie die Herstellung von Schallpartikeln aus diesen Homogenaten mittels Ammonsulfatfällung angegeben.

genat. Mit beiden Methoden wird etwa die gleiche Anreicherung erzielt. Da auch die membrangebundenen b- Cytochrome etwa vierfach angereichert werden und auch die Atmungsaktivitäten in den partikulären Fraktionen höher sind als im Homogenat, ist anzunehmen, daß beide Chinone zusammen mit dem Elektronentransportsystem in der Membran der Bakterien lokalisiert sind. Bei der Fällung mit Ammonsulfat werden die Chinone aus einem Schallhomogenat nicht so stark konzentriert wie bei der Ampicillinmethode oder der Lysozymmethode.

III.2.2. Fraktionierung eines Lysozymaufschlusses

Während der Gehalt an Ubichinon und der Gehalt an Menachinon beim Aufschluß mit Ampicillin in der partikulären Fraktion in gleicher Weise gegenüber dem Homogenat angereichert ist (Tabelle 4), sind in den partikulären Fraktionen beim Lysozymaufschluß und beim Aufschluß mit Ultraschall und Ammonsulfatfällung Ubichinon und Menachinon gegenüber den zugehörigen Schallhomogenaten jeweils unterschiedlich angereichert.

Dieser Befund läßt es möglich scheinen, daß Ubichinon und Menachinon sich durch geeignete Fraktionierung voneinander trennen lassen. Zur Untersuchung dieser Frage wurde im Experiment von Tabelle 5 ein Lysozymaufschluß feiner fraktioniert.

Die intakten Bakterien wurden aus dem Sphäroplastenlysat durch 15 min Zentrifugation bei 1 000 x g abgetrennt. Die Konzentrierung der partikulären Fraktion geschah durch 30 min lange Zentrifugation bei 40 000 x g. Der verbliebene Überstand wurde verdünnt und unter vorsichtigem Rühren mit Ammonsulfat versetzt, bis die Sättigung 70 % betrug. Das nach zweistündiger Inkubation ausgefallene Protein wurde über Nacht bei 0°C gegen 0.1 M Triäthanolamin - HCl pH 7.1 dialysiert. Dabei zerfiel das dialysierte Protein in einen wasserunlöslichen und einen wasserlöslichen Anteil. In den erhaltenen Fraktionen schwankt das Verhältnis von Ubichinon : Menachinon zwischen 0.9 und 3.2, jedoch kann keine Fraktion erzielt werden, welche nur eines der beiden Chinone enthält.

Wie der Quotient aus 280 nMol Ubichinon und 278 nMol Menachinon verglichen mit den Chinongehalten eines Schallhomogenats (0.84 : 0.87) aus Bakterien derselben Kultur zeigt, wurden die Chinone in allen Fraktionen mit befriedigender Genauigkeit wiedergefunden (Tabelle 5).

Aus der Tabelle 5 geht hervor, daß sich beide Chinone durch geeignete Fraktionierungsschritte teilweise voneinander trennen lassen. Da auch die Dehydrogenasen bei einem Zellaufschluß mit Lysozym unterschiedlich angereichert werden

Fraktion	Volumen (ml)	Proteingehalt (mg/ml)	Protein in der Fraktion (mg)	Chinongehalt (nMol/mg Protein)	Chinongehalt in der Fraktion (nMol)	Verhältnis Q : MK
Sediment (15 min 1 000 x g)	11	16.0	176	0.96	1.13	0.9
Partikuläre Fraktion (30 min 40 000 x g)	4	20.8	83	1.00	0.74	1.4
Wasserunlöslicher Teil des Überstands (70%-(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung + Dialyse)	1	12.4	12.4	2.67	0.84	3.2
Wasserlöslicher Teil des Überstands (70%-(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung + Dialyse)	27.5	9.6	26.4	0.10	0.08	1.3
					Σ 288	Σ 278
Schallhomogenat				0.84	0.87	1.0

TABELLE 5. Legende siehe Seite 29

Tabelle 5. Verteilung der Chinone auf die Fraktionen beim Zellaufschluß mit Lysozym.

E. coli K12 wurde vermindert aerob auf komplexem Medium gezogen. Der Lysozymaufschluß wurde durchgeführt wie unter Methoden angegeben. Die Fraktionierung des dabei entstehenden Überstandes ist im Text beschrieben.

(Tabelle 4), wird geschlossen, daß ein Teil der Chinone zusammen mit den Dehydrogenasen und den zwischen Dehydrogenasen und Chinonen liegenden Elektronentransportkomponenten angereichert wird und die Affinität des Ubichinons und des Menachinons zu den einzelnen Dehydrogenasen unterschiedlich groß ist.

III.3. Elektronentransport in Abhängigkeit von den Chinonen

III.3.1. Elektronentransport in aerob gezogenem E. coli K12

Im Versuch von Tabelle 6 ist die Extraktion und Reinkorporation von Chinonen an der partikulären Fraktion einer Lysozympräparation wiedergegeben.

Hierfür wurden die Bakterien vermindert aerob auf komplexem Medium in Gegenwart von 0.2 M Natriumhydrogencarbonat gezogen. Durch Zellaufschluß mit Lysozym wurde eine partikuläre Fraktion hergestellt (30 min 40 000 x g), welche lyophilisiert und mit Pentan extrahiert wurde. In die extrahierten Partikel wurden Q- 9, MK- 7 und Q- 9 + MK- 7 wieder eingebaut. Hierzu wurden die extrahierten Partikel mit den in Pentan gelösten Chinonen energisch geschüttelt. Die Abtrennung der Chinonlösungen von den Partikeln und deren Aufnahme in 0.5 M Sucrose erfolgte wie bei den extrahierten Partikeln.

Infolge der Extraktion der Chinone nehmen die Atmungsaktivitäten und fumaratreduzierenden Aktivitäten erheblich ab. Durch Reinkorporation von Q- 9 werden die Atmungsaktivitäten weitgehend restauriert, nicht jedoch die Aktivitäten, mit welchen Fumarat reduziert wird.

Durch die Reinkorporation von MK- 7 lassen sich keine Atmungsaktivitäten wiederherstellen. Das bedeutet, daß Menachinon am Elektronenfluß zum Sauerstoff nicht beteiligt ist und der Elektronentransport zu diesem Endakzeptor ausschließlich über Ubichinon verläuft.

Die anaerobe Reduktion des Fumarats ist in Gegenwart von Menachinon zumindest mit Benzylviologen außerordentlich hoch, während der Wiedereinbau von Ubichinon keine Steigerung des Elektronenflusses zum Fumarat mit Benzylviologen als Donor ergibt. Da der Farbstoff jedoch auch in Abwesenheit von Menachinon mit den Flavinen der Fumaratreduktase wie auch der Succinatdehydrogenase reagiert (vgl. Ergebnisse III,6.), darf dieses Ergebnis nicht überinterpretiert werden. Eine eindeutige Wiederherstellung des Elektronentransportweges zum Fumarat sollte vielmehr mit einem natürlichen Substrat bzw. Donor

Präparat	Chinongehalt (μ Mol/g Prot.)		Atmungsaktivität (μ Atom O/g Prot./min)		Fumaratreduktion (μ Mol Fumarat/g Prot./min)			
	Q	MK	NADH For Succ	D- Lac	Benzylviologen	NADH		
Ursprüngliche Partikel	4.27	1.14	446	422	75	118	65	21
Lyophilisierte Partikel	6.31	4.55	476	314	35	116	72	15
Extrahierte Partikel	0.18	0.10	35	23	13	17	54	0
Reinkorporierte Partikel (Q- 9)	64.0	n.g.	377	173	77	63	57	0
Reinkorporierte Partikel (MK- 7)	-	16.81	36	18	20	14	152	*
Reinkorporierte Partikel (Q- 9 + MK- 7)	24.5	7.9	94	102	95	89	87	1.5

TABELLE 6. Legende siehe Seite 32

Tabelle 6. Extraktion und Reinkorporation der Chinone an Partikeln aus aerob gezogenem E. coli K12

Durch Lysozymaufschluß hergestellte Partikel (= ursprüngliche Partikel) wurden in 0.15 M KCl suspendiert und lyophilisiert (Methoden II.1.3.1.a). Die Extraktion mit Pentan und die Reinkorporation der Chinone ist unter Methoden II.1.3.1.b - c beschrieben.

n. g. : nicht gefunden, * : wird nicht anaerob

nachgewiesen werden, weil dann diejenigen Prozesse erfaßt werden, welche auch in vivo ablaufen. Die Wiederherstellung der Fumaratreduktion mit NADH war jedoch in dem Experiment zur Tabelle 6 sehr gering.

III.3.2. Elektronentransport in anaerob gezogenem E. coli K12

Die Abhängigkeit der NADH- Fumaratreduktase von Menachinon wurde daher an E. coli K12 untersucht, welches anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen wurde (Tabelle 7). Unter diesen Wachstumsbedingungen sind die Gehalte an Menachinon sowie die Aktivität der NADH- Fumaratreduktase höher als bei der Zucht auf Glucose oder komplexem Medium (Tabelle 2).

Beim Gefriertrocknen ergeben sich gegenüber den ursprünglichen Partikeln geringe Unterschiede in den Chinongehalten und Atmungsaktivitäten; der Verlust an NADH- Fumaratreduktase ist dagegen relativ groß. Das kommt daher, daß sowohl die Atmungsaktivität mit NADH und damit die Aktivität der NADH- Dehydrogenase nebst dem Gehalt an Menachinon abnehmen.

Als Folge der Extraktion sind die Atmungsaktivitäten und die Reduktion von Fumarat gegenüber den lyophilisierten Partikeln erniedrigt. Im Falle der Fumaratreduktion werden 77 % der Aktivität mit NADH und jeweils 100 % der Aktivität mit Formiat und D- Laktat eingeblüßt.

Die Reinkorporation von Q- 9 restauriert genau wie im Experiment zur Tabelle 6 die Atmungsaktivitäten, während der Wiedereinbau von MK- 7 für die Atmung auch in Partikeln aus anaerob gezogenem E. coli K12 wirkungslos bleibt.

Anders verhält es sich mit der Fumaratreduktion : im Falle der NADH- Fumaratreduktaseaktivität wird diese gegenüber den lyophilisierten Partikeln entsprechend der Menge des reinkorporierten Menachinons zu 48 % bzw. 59 % durch MK- 7 wiederhergestellt. Der Wiedereinbau von Q- 9 erhöht die Aktivität der NADH- Fumaratreduktase gegenüber den lyophilisierten Partikeln nicht.

Daraus läßt sich ableiten, daß Ubichinon in Partikeln aus aerob wie anaerob gezogenen Bakterien eine Komponente der Atmungskette ist und sich an der Reduktion des Fumarats nicht beteiligt. Ohne Ubichinon läuft die Atmung nicht mehr ab; die Aktivität in den extrahierten Partikeln dürfte auf das noch vorhandene Ubichinon zurückzuführen sein.

Menachinon nimmt an der Atmung in aerob wie anaerob gezogenen Bakterien nicht teil; es ist dagegen für die Reduktion des Fumarats notwendig.

Präparat	Chinongehalt ($\mu\text{Mol/g Prot.}$)		Atmungsaktivität ($\mu\text{Atom O/g Prot.}/\text{min}$)		Fumaratreaktion ($\mu\text{Mol Fumarat/g Prot.}/\text{min}$)	
	Q	MK	NADH	For Succ D-Lac L-Lac	NADH	For D-Lac
Ursprüngliche Partikel	1.48	3.28	375	1600 254 119 104	180	33 41
Lyophilisierte Partikel	1.94	2.79	299	1445 262 140 49	94	30 45
Extrahierte Partikel	0.32	0.29	19	149 56 30 17	22	0 0
Reinkorporierte Partikel (Q- 9)	39.28	0.27	514	1605 203 95 62	18	0 0
Reinkorporierte Partikel (MK- 7)	0.51	7.52	14	81 59 0 0	45	11 0
Reinkorporierte Partikel (Q- 9 + MK- 7)	28.32	17.35	246	1220 165 43 41	55	22 18

Tabelle 7. Extraktion und Reinkorporation der Chinone an Partikeln aus anaerob gezogenem E. coli K12

E. coli K12 wurde anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen wie unter Methoden II.1.1.4. beschrieben. Schallpartikel wurden durch Ammonsulfatfällung bei 30 % Sättigung aus einem Schallhomogenat hergestellt (Methoden II.1.2.3.). Die Präparation von lyophilisierten, extrahierten und reinkorporierten Partikeln ist unter Methoden II.1.3.2. angegeben.

Insgesamt ergibt sich aus den Extraktions- und Reinkorporationsversuchen in den Tabellen 6 und 7, daß Ubichinon und Menachinon in E. coli K12 in verschiedenen Elektronentransportwegen wirken und kein Chinon die Funktion des anderen Chinons übernimmt.

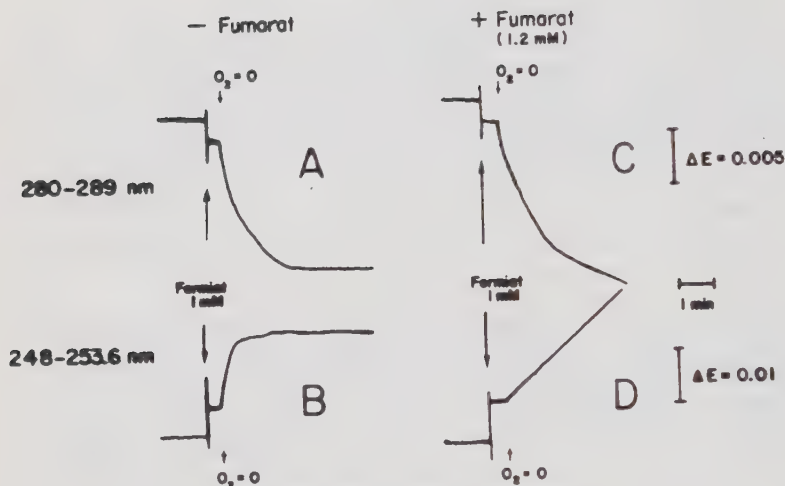
III.4. Redoxverhalten der Chinone

III.4.1. Die Chinone im Fließgleichgewicht der Atmung und der Fumaratreduktion

Mit dem Zweiwellenlängenphotometer lassen sich die Redoxbewegungen der Chinone in der Membran direkt beobachten (5). Bei 280 - 289 nm wird die Absorption des oxidierten Ubichinons bei minimaler Interferenz mit Menachinon und bei 248 - 253.6 nm die Absorption des reduzierten Menachinons bei minimaler Interferenz mit Ubichinon beobachtet. Außerdem kann bei beiden Wellenlängenpaaren registriert werden, welchen Einfluß Fumarat auf die Reduktion der Chinone im Aeroben und Anaeroben ausübt.

Durch Zusatz von Formiat zu einer Suspension aus membranhaltigen Partikeln wird der Elektronentransport gestartet. Bei 280 - 289 nm wird eine geringe Abnahme und bei 248 - 253.6 nm eine geringe Zunahme der Absorption registriert (Figur 1, A, B). Wenn der Sauerstoff erschöpft ist ($O_2 = 0$), wird bei 280 - 289 nm eine weitere Absorptionsabnahme und bei 248 - 253,6 nm eine weitere Absorptionszunahme beobachtet. Beide Absorptionsänderungen sind beim Übergang vom Fließgleichgewicht der Atmung in den anaeroben Zustand größer als beim Übergang vom Zustand ohne Substrat in den stationären Zustand der Atmung.

Der Betrag der Absorptionänderungen beim Übergang vom Zustand ohne Substrat in den anaeroben Zustand entspricht den durch Extraktion bestimmten Gesamtgehalten der Chinone. Dieses Ergebnis wird erhalten, wenn die Absorptionsänderungen unter Berücksichtigung der gegenseitigen Interferenz der Chinone bei den benutzten Wellenlängenpaaren ausgewertet werden (Tabelle 8, erste Zeile). Im stationären Zustand der Atmung mit Formiat ist Ubichinon zu etwa 15 % und Menachinon zu etwa 30 % in der für Figur 1 verwendeten Präparation reduziert.



Figur 1. Redoxverhalten von Ubichinon und Menachinon in einer partikulären Fraktion aus *E. coli* K12

E. coli K12 wurde anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen. Schallpartikel wurden durch Ammonsulfatfällung bei 30 % Sättigung aus einem Schallhomogenat präzipitiert und in 0.15 M KCl lyophilisiert (Methoden II.1.1.4., II.1.2.3. und II.1.3.2.a). Die lyophilisierten Schallpartikel wurden in 0.5 M Sucrose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 auf 2.6 mg/ml Protein suspendiert. Die Schichtdicke der Küvette war 0.2 cm.

Die Atmungsaktivität mit Formiat war 616 μ Atom O/g Prot./min; die Aktivität der Fumaratreduktion mit Formiat betrug 12 μ Mol Fumarat/g Prot./min.

(C) und (D): Fumarat wurde vor der Zugabe von Formiat 1.2 mM vorgelegt, um eine mögliche Überlagerung mit der Fumarasereaktion aufzudecken. Die für die Figur 1 verwendete Präparation enthielt keine Fumarase.

Im Experiment von Figur 1 C, D wurde zunächst Fumarat zu der Partikelsuspension gegeben. Danach wurde erneut das Redoxverhalten der Chinone auf Zusatz von Formiat verfolgt. Die Absorptionsänderungen beim Übergang in den stationären Zustand der Atmung werden durch die Gegenwart von Fumarat kaum verändert. Beim Übergang in den anaeroben Zustand nimmt die Absorption bei 280 - 289 nm zunächst infolge der Reduktion der Chinone rasch ab und geht in eine langsame und stetig verlaufende Absorptionsänderung über.

Diejenige Menge an Chinon, welche vor der Einstellung des Fließgleichgewichts zum Fumarat reduziert wird, ist bei 280 - 289 nm nur wenig geringer als ohne Fumarat (Figur 1, A, C). Im Gegensatz dazu wird bei 248 - 253.6 nm nach Erschöpfung des Sauerstoffs keine weitere Reduktion der Chinone beobachtet und nur eine mit der Reduktion des Fumarats verbundene Absorptionsänderung gefunden.

Die Auswertung der beiden Registrierungen (Figur 1, C, D) ergibt, daß Ubichinon im anaeroben Zustand mit Formiat und Fumarat vollständig und Menachinon zu 38 % reduziert ist (Tabelle 8, zweite Zeile). Dieses Ergebnis bestätigt die ausschließliche Beteiligung von Menachinon am Elektronentransport zum Fumarat.

Experiment (in Figur 1)	Übergang	Extinktionsänderung (ml/g Prot./cm)	% Chinon reduziert	Q	MK
A und B	ohne Substrat				
	→ anaerob	- 25	35	103	108
C und D	ohne Substrat				
	→ anaerob in Ggw. von Fumarat	- 22	16	105	37
Chinongehalte (μ Mol/g Prot.) : 2.2 1.2					

Tabelle 8. Reduktion von Ubichinon und Menachinon nach Zugabe von Formiat in Abwesenheit und Gegenwart von Fumarat

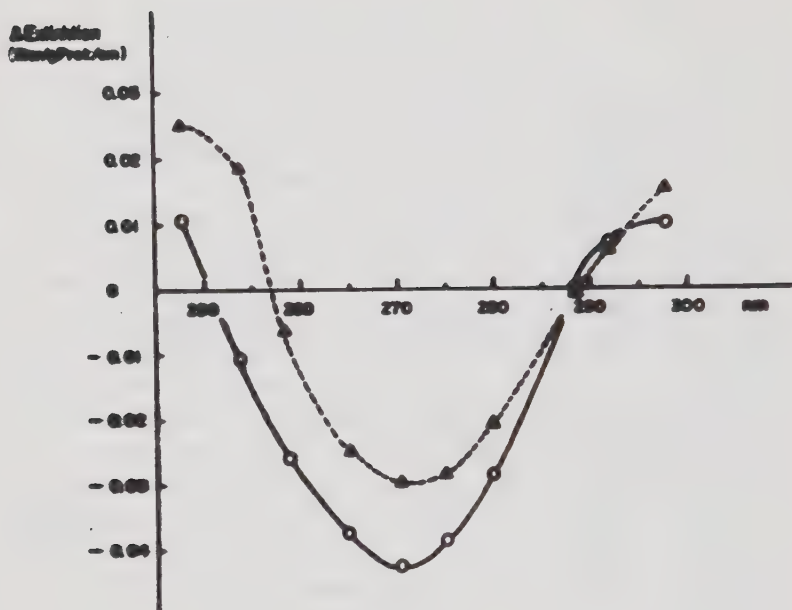
Die in Figur 1 enthaltenen Absorptionsänderungen sind unter Berücksichtigung der Differenzextinktionskoeffizienten von Ubichinon und Menachinon bei den verwendeten Wellenlängenpaaren (Methoden II.2.1.1.) quantitativ ausgewertet und mit den durch Extraktion bestimmten Chinongehalten verglichen.

III.4.2. Differenzspektren der Chinone

Durch Registrierung der Absorptionsdifferenzen auf Zugabe von Formiat läßt sich ein Differenzspektrum konstruieren (Figur 2, gestrichelte Linie). Dieses Spektrum entspricht etwa dem aus den Chinongehalten konstruierten Spektrum (Figur 2, ausgezogene Linie). Dadurch wird erneut unterstrichen, daß die beobachteten Absorptionsänderungen bei Zugabe von Formiat zum membranhaltigen Partikeln im wesentlichen durch die Redoxreaktionen der Chinone verursacht werden.

Zur Konstruktion des Differenzspektrums aus den beobachteten Absorptionsänderungen wurden in der Figur 2 nur die Absorptionsdifferenzen beim Übergang vom stationären Zustand der Atmung in den anaeroben Zustand verwendet und nicht die Absorptionsdifferenzen beim Übergang vom Zustand ohne Substrat in den anaeroben Zustand. Dennoch kommt das so erhaltene Differenzspektrum an das errechnete Spektrum nahe heran.

Daraus läßt sich ableiten, daß auch in dieser Präparation im Fließgleichgewicht der Atmung beide Chinone mehr oxidiert als reduziert vorlagen. Weiter darf aus den Experimenten zu den Figuren 1 und 2 verallgemeinert werden, daß Partikel aus anaerob oder aerob gezogenen Bakterien, welche nach verschiedenen Zellaufschlußmethoden hergestellt wurden, keine Unterschiede in den Redoxreaktionen aufweisen.



Figur 2. Differenzspektrum einer partikulären Fraktion aus *E. coli* K12 beim Übergang vom stationären Zustand der Atmung in den anaeroben Zustand.

E. coli K12 wurde vermehrt aerob auf komplexem Medium gezogen und mit Lysozym und EDTA eine partikuläre Fraktion (30 min bei 40 000 x g) hergestellt (Methoden II.1.2.2.). Der Gehalt an Q betrug 2.94 $\mu\text{Mol/g Prot.}$, der Gehalt an MK 0.66 $\mu\text{Mol/g Prot.}$ Die Atmungsaktivität mit Formiat war 370 $\mu\text{Atom O/g Prot./min.}$ Die Partikel wurden in 0.5 M Sucrose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 suspendiert auf 2.02 mg/ml Protein. Die Schichtdicke der Küvette war 0.2 cm.

Als Bezugswellenlänge wurde für alle Meßpunkte 289 nm gewählt, da beide Chinone an dieser Stelle die geringste Extinktionsdifferenz zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand besitzen.

---▲---: Extinktionsänderung beim Übergang vom stationären Zustand der Atmung mit Formiat zum anaeroben Zustand. —○—: Differenzspektrum von 2.94 $\mu\text{Mol/g Prot. Q}$ + 0.66 $\mu\text{Mol/g Prot. MK.}$

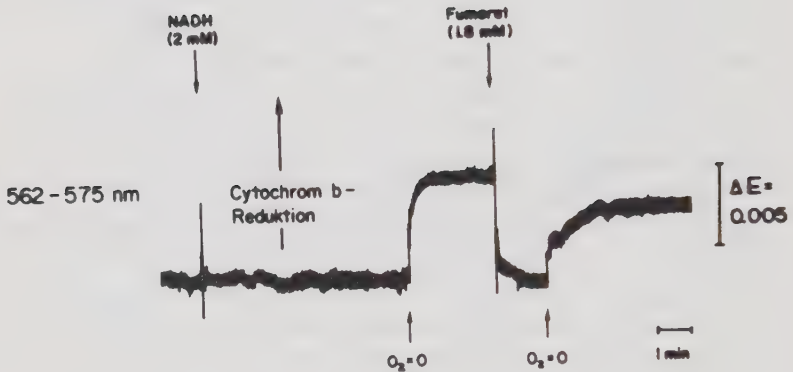
III.5. Die Cytochrome

III.5.1. Redoxverhalten der b- Cytochrome

Im Experiment von Figur 3 wurde die Absorption von Schallpartikeln bei 562 - 575 nm registriert. Bei diesem Wellenlängenpaar werden fast ausschließlich die Redoxbewegungen der membrangebundenen b- Cytochrome beobachtet.

Auf Zugabe von NADH werden die b- Cytochrome nur sehr wenig reduziert. (Auch Ubichinon und Menachinon sind unter diesen Bedingungen stärker oxidiert als reduziert, s. Abschnitt III.4.1.). Zum Zeitpunkt der Sauerstofferschöpfung werden die b- Cytochrome weitgehend, evtl. sogar vollständig reduziert. Bei der Zugabe von Fumarat wird Sauerstoff in die Küvette gerührt und die b- Cytochrome werden reoxidiert.

Nachdem erneut der anaerobe Zustand erreicht ist, stellt sich das Fließgleichgewicht zum Fumarat ein (s. a. Figur 1, C, D). In diesem Fließgleichgewicht ist weniger b- Cytochrom reduziert als im anaeroben Zustand in Abwesenheit von Fumarat. Demnach wird also membrangebundenes Cytochrom b durch Fumarat reoxidiert, was für die Beteiligung eines oder mehrerer b- Cytochrome am Elektronentransport zum Fumarat spricht.



Figur 3. Reduktion von b- Cytochromen und deren partielle Reoxidation durch Fumarat

E. coli K12 wurde anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen und Schallpartikel durch Ultraschall und Ammonsulfatfällung hergestellt und lyophilisiert (Methoden II.1.1.4., II.1.2.3., II.1.3.2.a). Die lyophilisierten Schallpartikel wurden in 0.5 M Sucrose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 aufgenommen. Die Proteinkonzentration war 2.45 mg/ml, die Schichtdicke der Küvette 0.5 cm. Die Atmungsaktivität mit NADH war 118 μ Atom O/g Prot./min, die NADH- abhängige Fumaratreduktaseaktivität 34 μ Mol Fumarat/g Prot./min.

III.5.2. Differenzspektren der Cytochrome

Die Beteiligung anderer Cytochrome am Elektronentransport zu Sauerstoff und Fumarat läßt sich wie bei den Chinonen durch Differenzspektren beweisen (Figur 4). Schallpartikel aus anaerob gezogenem *E. coli* K12 wurden mit NADH und Formiat reduziert und die Differenzspektren mit oxidierten (Figur 4, A, B) und im stationären Zustand zum Fumarat befindliche Partikel (Figur 4, C, D) aufgenommen.

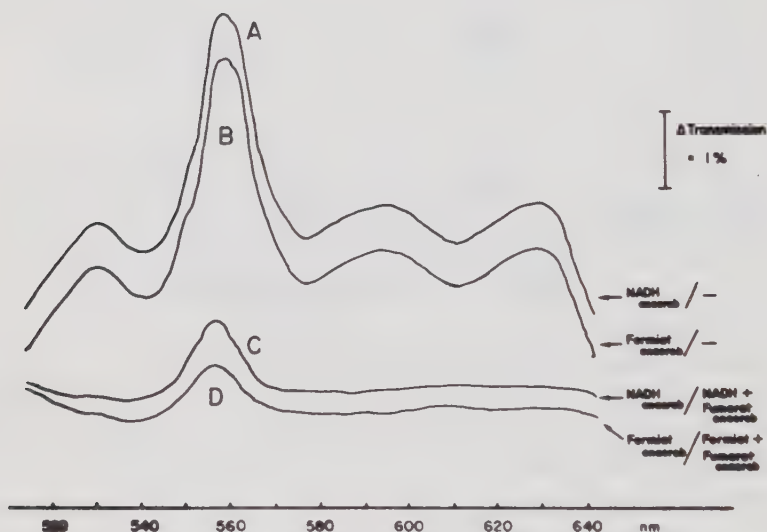
Die Differenz zwischen reduzierten und oxidierten Absorptionsspektren ergibt mit NADH und Formiat als Donoren zwei deckungsgleiche Differenzspektren (Figur 4, A, B). Das bedeutet, daß beide Substrate die gleichen Cytochrome im selben Ausmaß reduzieren. Das Differenzspektrum mit Natriumdithionit statt mit NADH und Formiat weist eine geringfügig größere Bandenhöhe auf (nicht gezeigt).

Das Maximum bei 630 nm wird durch Cytochrom a_2 , das Maximum bei 595 nm durch Cytochrom a_1 hervorgerufen. An dem Maximum bei 559 nm sind mit Sicherheit b- Cytochrome, wahrscheinlich auch Cytochrom o beteiligt. Die Beteiligung von b- Cytochromen an dem Maximum bei 559 nm geht auch aus dem Maximum bei 530 nm hervor, denn Cytochrom b_1 von *E. coli* hat bei 559 nm eine α -Bande und eine β -Bande bei 530 nm. (26)

Die beiden kleineren Banden im stationären Zustand der Fumaratreduktion (Figur 4, C, D) werden durch die partielle Oxidation von mindestens einem b- Cytochrom hervorgerufen. Ihr Maximum liegt bei 557 nm und ihre Höhe beträgt 20 - 25 % der beiden größeren Banden (Figur 4, A, B). Nur eines oder mehrere Cytochrome vom Typ b werden durch Fumarat oxidiert, während die anderen Cytochromtypen reduziert bleiben und demgemäß nicht am Elektronentransport zum Fumarat beteiligt sind.

Die Tatsache, daß alle b- Cytochrome durch NADH und Formiat im gleichen Ausmaß reduziert und durch Fumarat auch gleichstark oxidiert werden, unabhängig davon, ob die Elektronen vom NADH oder Formiat zum Fumarat fließen, macht ein Redoxpotential (E_o') in der Nähe des Succinat- Fumarat- Paares

für das oder die im Elektronentransportweg zum Fumarat enthaltenen b- Cytochrome wahrscheinlich.



Figur 4. Differenzspektren von Membranen mit hoher Fumarat-reduktaseaktivität

E. coli K12 wurde anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen und Schallpartikel mittels Ultraschall und Ammonsulfatfällung hergestellt (Methoden II.1.1.4. und II.1.2.3.). Die Atmungsaktivität mit NADH war $540 \mu\text{Atom O/g Prot./min}$, die mit Formiat $923 \mu\text{Atom O/g Prot./min}$. Die NADH- abhängige Fumaratreduktion betrug $212 \mu\text{Mol Fumarat/g Prot./min}$, die Formiat- abhängige Fumaratreduktion $12 \mu\text{Mol Fumarat/g Prot./min}$. Die Proteinkonzentration war 3.15 mg/ml , die Schichtdicke der Küvette 0.5 cm . Das Protein wurde in dem gleichen Puffer suspendiert wie in der Legende zur Figur 3 angegeben. NADH wurde 1.6 mM , Formiat 1.1 mM vorgegeben. Die Konzentration an Fumarat in (C) und (D) war 1.8 mM .

III.6. Die Übertragung der Elektronen auf Fumarat

III.6.1. Kinetische Unterscheidung zwischen Fumaratreduktase und Succinatdehydrogenase

Fumaratreduktase und Succinatdehydrogenase katalysieren mit Farbstoffen die Reaktionen



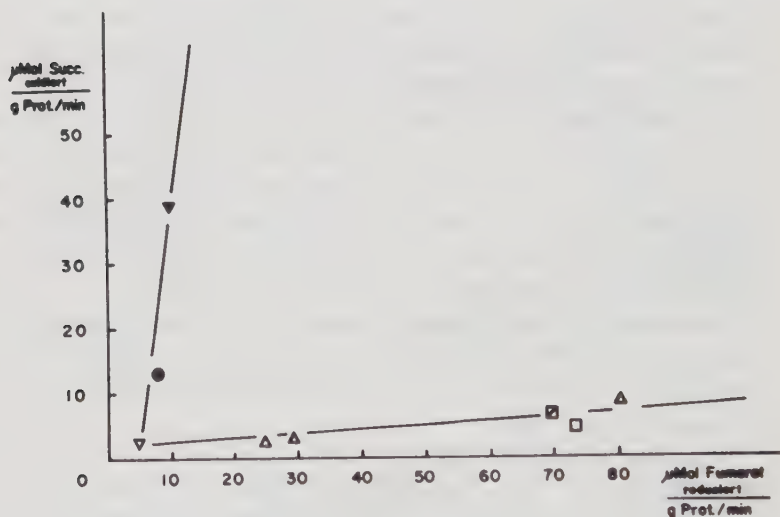
Das Verhältnis der beiden Aktivitäten ist für Fumaratreduktase zugunsten der Reaktion (1) verschoben und für Succinatdehydrogenase zugunsten der Reaktion (2).

Im Experiment von Figur 5 wurde das Verhältnis der Aktivitäten der beiden Reaktionen durch die Zuchtbedingungen variiert. Dazu wurde *E. coli* in Gegenwart von Thioglycolat auf physiologischen C_3 -Verbindungen gezogen. Unter diesen Bedingungen sind die Gehalte an Menachinon und die fumaratreduzierenden Aktivitäten relativ groß (Tabellen 2, 7). In einer zweiten Versuchsserie wurde *E. coli* aerob auf Glucose bzw. komplexem Medium gezogen, um möglichst hohe Gehalte an Ubichinon (Tabelle 1) und an Succinatdehydrogenase zu erhalten.

Aus den jeweiligen Zuchtansätzen wurden Schallhomogenate hergestellt und die fumaratreduzierende Aktivität mit Benzylviologen als Donor gegen die succinatoxidierende Aktivität mit Methylenblau als Akzeptor aufgetragen (Figur 5). Für jedes Schallhomogenat ergibt das einen Meßpunkt.

Die Farbstoffe wurden gewählt, um in einem beliebig fraktionierten Schallhomogenat das Verhältnis der beiden Aktivitäten zueinander bestimmen zu können, und zwar so, daß beide Enzyme erfaßt werden. Atmungsaktivitäten und NADH-Fumaratreduktaseaktivitäten geben weniger die Aktivitäten von Succinatdehydrogenase und Fumaratreduktase wieder als vielmehr die Intaktheit von ganzen Elektronentransportketten und es ist denkbar, daß isolierte Fumaratreduktase oder Succinatdehydrogenase nurmehr mit Farbstoffen zu erfassen sind.

In den Schallhomogenaten mit relativ viel Fumaratreduktase ist das Verhältnis aus fumaratreduzierender Aktivität mit Benzylviologen und succinatoxidierender Aktivität mit Methylenblau 11. In den Schallhomogenaten ohne Fumaratreduktase oder mit nur sehr wenig Fumaratreduktase ist dieses Verhältnis 0.25. Mit Hilfe dieser Quotienten läßt sich bei der Fraktionierung aufgeschlossener Zellen ermitteln, ob in einer bestimmten Fraktion mehr Fumaratreduktase gegenüber Succinatdehydrogenase angereichert wurde oder umgekehrt.



Figur 5. Beziehung zwischen fumaratreduzierender Aktivität und succinatoxidierender Aktivität in Schallhomogenaten aus anaerob und aerob gezogenem E. coli K12.

E. coli K12 wurde in einer ersten Versuchsserien anaerob in Gegenwart von Thioglycolat auf Pyruvat, D- Laktat und Fumarat sowie D,L- Laktat und Fumarat gezogen (Methoden II.1.1.3.). In einer zweiten Versuchsserien wurde E. coli K12 aerob auf Glucose bzw. komplexem Medium gezogen; der Luftstrom war 8 l/min, die Rührgeschwindigkeit 1 500 Umdrehungen/min. Offene Symbole anaerobe Zucht, geschlossene Symbole aerobe Zucht.

△: Pyruvat 50 mM, ◻: D- Laktat und Fumarat je 50 mM, □: D,L- Laktat und Fumarat je 50 mM, ▽: Glucose 0.2 %, ○: komplexes Medium.

III.6.2. Verteilung von Fumaratreduktase und Succinatdehydrogenase auf die Fraktionen bei verschiedenen Zellaufschlüssen

Wenn Fumaratreduktase und Succinatdehydrogenase fest in der Membran gebunden sind, dann darf erwartet werden, daß bei jeder Art des Zellaufschlusses das Verhältnis von fumaratreduzierender zu succinatoxidierender Aktivität für ein und dieselbe Kultur konstant ist und daß sich auch bei der Fraktionierung der aufgeschlossenen Zellen dieses Verhältnis nicht ändert.

Im Versuch zur Tabelle 9 wurde *E. coli* anaerob auf D,L-Laktat und Fumarat gezogen und die Ernte nach zwei verschiedenen Methoden aufgeschlossen. In den erhaltenen Fraktionen wurde das Verhältnis von fumaratreduzierender zu succinatoxidierender Aktivität bestimmt. Atmungsaktivitäten und fumaratreduzierende Aktivitäten mit natürlichen Donoren sind in der Tabelle 9 ebenfalls enthalten.

Die partikuläre Fraktion beim Lysozymaufschluß (Sediment) enthält von allen Fraktionen das meiste Menachinon. Die Atmungsaktivitäten - d. h. Aktivitäten, welche ohne die Mitwirkung von Menachinon zustande kommen (Abschnitt III.3.) - sind mit Ausnahme der Succinatveratmung in dieser Fraktion geringer als in einem Schallhomogenat. Die Atmungsaktivität mit Succinat ist 1.4 mal größer, die NADH- Fumaratreduktaseaktivität dagegen 2.9 mal kleiner als im Schallhomogenat. Da auch die Reduktion des Fumarats mit Benzylviologen gegenüber dem Schallhomogenat mit geringerer Aktivität verläuft, während die Succinatoxidation mit Methylenblau gegenüber dem Schallhomogenat beinahe doppelt so rasch ist, kann geschlossen werden, daß in der partikulären Fraktion beim Zellaufschluß mit Lysozym nur noch wenig Fumaratreduktase vorhanden ist. Der niedere Quotient von 2.3 aus den Aktivitäten mit den Farbstoffen unterstreicht dies. Viel Fumaratreduktase wurde von der in der partikulären Fraktion verbliebenen Succinatdehydrogenase getrennt.

Im Überstand der Lysozympräparation ist das Verhältnis aus den Aktivitäten mit den Farbstoffen Benzylviologen und Methylenblau mit 0.9 noch mehr zugunsten der Succinatdehydrogenase verschoben. Da in diesem Überstand noch relativ hohe Atmungsaktivitäten enthalten sind, während die Fumaratreduktaseaktivität mit natürlichen Substraten nur noch verschwindend gering ist, ergibt sich, daß bei der Lysozympräparation die Fumaratreduktase praktisch völlig von denjenigen Membranbestandteilen abgetrennt wird, welche den Elektronentransportweg zum Sauerstoff zusammensetzen.

Die Fraktionierung des Schallhomogenats durch Zentrifugation beweist, daß auch beim Zellaufschluß durch Ultraschall ein Teil der Fumaratreduktase von der in der Membran verbliebenen Succinatdehydrogenase getrennt wurde. Zwar ist die meiste Fumaratreduktase sicher in denjenigen Partikeln gebunden, welche bei $140\,000 \times g$ sedimentieren, wie die hohe NADH- Fumaratreduktaseaktivität von $117 \mu\text{Mol Fumarat/g Protein/min}$ beweist. Aber im Überstand wird nach der Zentrifugation auch NADH- Fumaratreduktaseaktivität gefunden und der Quotient aus fumaratreduzierender und succinatoxidierender Aktivität mit den Farbstoffen ist von allen Fraktionen in der Tabelle 9 mit 6.6 am weitesten zugunsten der Fumaratreduktase verschoben. Daraus läßt sich ableiten, daß im Überstand mehr Fumaratreduktase getrennt von Succinatdehydrogenase vorliegt als in den größeren Membranstücken (Sediment), wo das in- vivo- Verhältnis von Fumaratreduktase zu Succinatdehydrogenase am ehesten erhalten ist.

Bei der Fraktionierung des Schallhomogenats durch Ammonsulfatfällung bei 30 % Sättigung werden die kleinen Partikel, welche durch Zentrifugation bei $140\,000 \times g$ nicht mehr konzentriert werden können, quantitativ mit den größeren Partikeln ausgefällt. Dadurch erreicht die NADH- Fumaratreduktaseaktivität von allen Fraktionen in der Tabelle 9 den höchsten Wert und auch der Quotient aus fumaratreduzierender und succinatoxidierender Aktivität mit den Farbstoffen ist mit 5.6 noch deutlich zugunsten der Fumaratreduktase verschoben. Durch die Fällung der kleinen fumaratreduktasehaltigen Partikel aus dem "löslichen" Überstand wird die Aktivität der-

jenigen Dehydrogenasen, welche fest in den großen Partikeln gebunden sind, unterschiedlich verringert. So ist vor allem die Atmungsaktivität der Succinatdehydrogenase in dem durch Ammonsulfatfällung präzipitierten Präparat beinahe zweimal geringer als in den bei 140 000 x g abzentrifugierten Partikeln.

Daraus läßt sich ebenfalls ableiten, daß Succinatdehydrogenase eng mit den anderen festgebundenen Elektronentransportkomponenten, welche den Weg zum Sauerstoff zusammensetzen, verbunden ist und auch bei den verschiedenen Zellaufschlußmethoden nicht leicht von diesen anderen Komponenten abgetrennt wird. Anders verhält sich Fumatreduktase. Dieses Enzym ist offensichtlich lockerer gebunden und läßt sich auf mechanische Weise weitgehend von denjenigen Elektronentransportkomponenten trennen, welche den Weg zum Sauerstoff zusammensetzen.

Zellauf- schluß- methode	Fraktion	Chinongehalt (μ Mol/g Prot.)	Atmungsaktivität (μ Atom O/g Prot./min)	Fumaratreduktion (μ Mol Fumarat/ g Prot./min)	Succinatoxi- dation (μ Mol Succel- nat/g Prot./ min)	Verhältnis Fumaratreduktion Succinatoxi- dation
		MK	NADH For Succ D-Lac	NADH For D-Lac BVH		

Lysozym	Sediment (30 min bei 40 000 x g) Überstand	5.19	28 435 141 25	14 - - 270	119	2.1
		1.70	92 92 69 40	- 3.2 3.2 124	139	0.9
Ultraschall	Schallho- mogenat	1.24	148 450 99 71	41 - - 320	65	4.9

Ultraschall	Zentri- fugation (60 min bei 120 000 x g) Überstand	1.62	242 818 174 73	117 9 12 526	129	4.1
		1.44	31 39 36 29	5.7 - - 79	12.1	6.6

Ultraschall	Ammonsul- fatfällung (30 min bei 40 000 x g) Überstand nach Dialyse	3.06	165 818 89 65	154 10 14 736	133	5.6
		0.75	0 0 0 0	+ + + 4.85	7.8	0.6

TABELLE 9. Legende siehe Seite 52

Tabelle 9. Vergesellschaftung der Fumaratreduktase mit anderen Elektronentransportkomponenten in E. coli K12

E. coli K12 wurde anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen (Methoden II.1.1.4.). Von der gewaschenen Ernte (2.3 g Trockengewicht) wurde ein Drittel dem Lysozymaufschluß unterworfen, der Rest 3 x 5 sec in 0.5 M Sucrose beschallt. Von dem Schallhomogenat wurde ein Teil 60 min bei 140 000 x g zentrifugiert, ein anderes Aliquot mit Ammonsulfat bei 30 % Sättigung 30 min bei 0°C unter leichtem Rühren inkubiert. Das ausgefallene Protein wurde 20 min bei 40 000 x g abzentrifugiert und das Sediment in 0.5 M Sucrose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 aufgenommen. Der Überstand wurde 24 Stunden gegen 0.1 M Triäthanolamin- HCl pH 7.1 dialysiert.

+ : nicht messbar, da hohe Fumaraseaktivität

BHV : reduziertes Benzylviologen, MB : Methylenblau

III.7. Die Funktion der Fumaratreduktion im anaeroben Stoffwechsel von *E. coli* K12

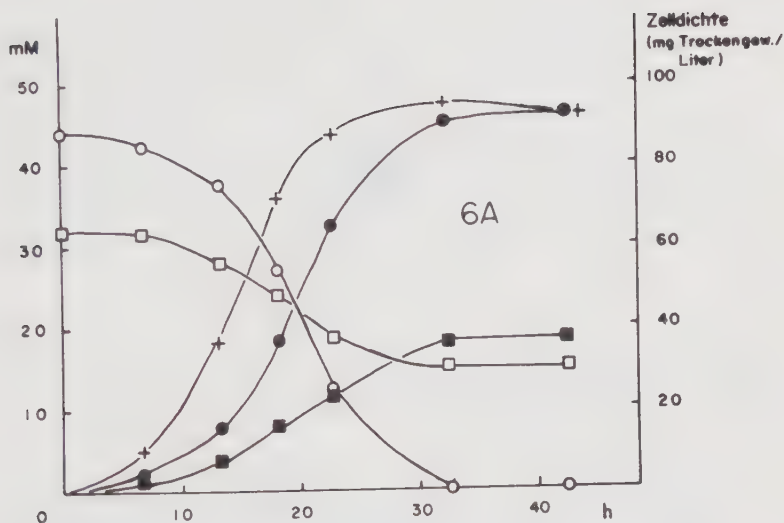
E. coli wächst unter anaeroben Bedingungen weder auf Laktat noch Fumarat allein (25), doch findet Zellvermehrung statt, wenn beide Substrate zusammen angeboten werden. Das Vorhandensein hoher Fumaratreduktasegehalte unter diesen Zuchtbedingungen deutet darauf hin, daß das Fumarat nicht nur in geeigneten Membranfraktionen, sondern auch in intakten Bakterien, d. h. in vivo, der Akzeptor für den bei den Oxidationen des Laktats intermediär anfallenden Wasserstoff ist.

III.7.1. Die Stöchiometrie der wachstumsunterhaltenden Reaktion bei anaerober Zucht auf D,L- Laktat und Fumarat

Zur Ermittlung der wachstumsunterhaltenden Reaktion wurde *E. coli* K12 anaerob auf 50 mM D,L- Laktat und 50 mM Fumarat gezogen. Der Gehalt an Substraten und ausgeschiedenen Endprodukten wurde in regelmäßigen Zeitabständen zusammen mit der Zelldichte bestimmt (Figur 6, A).

Die Kultur geht nach etwa 10 Stunden in die exponentielle Phase und nach etwa 20 Stunden in die stationäre Phase. Die Abnahme der Konzentration an Fumarat und Laktat erfolgt gleichzeitig mit der Zellvermehrung, ebenso die Ausscheidung von Succinat und Acetat. Sowie das Fumarat verbraucht ist, kommt die Zellvermehrung zum Stillstand. L-Laktat ist zu diesem Zeitpunkt noch vorhanden; die Konzentration an D-Laktat ändert sich während des gesamten Wachstums nicht (nicht gezeigt, D- Laktat 2.4 mM). Formiat wird unter den gewählten Zuchtbedingungen (pH 6.5) nicht gebildet; bei Anzucht auf alkalischerem Milieu entsteht dagegen Formiat (nicht gezeigt).

Durch Auftragung der verbrauchten Fumaratmenge (Δ Fumarat) gegen die Abnahme der Laktatkonzentration (Δ L - Laktat) und die zugehörigen Konzentrationen an ausgeschiedenem Succinat und Acetat läßt sich die Gleichung der wachstumserhaltenden Reaktion ermitteln (Figur 6, B).



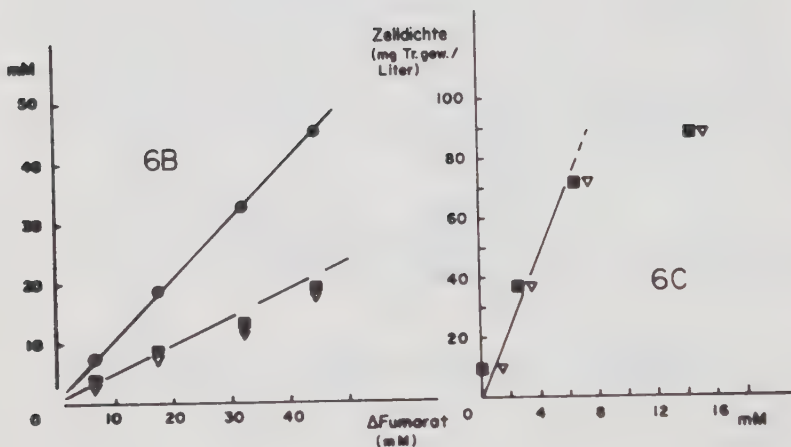
Figur 6. Ermittlung der Wachstumsbilanz bei anaerober Zucht von *E. coli* K12 auf D,L- Laktat und Fumarat und des molaren Wachstumsertrags Y_{Acetat}

(A): *E. coli* K12 wurde anaerob auf D,L- Laktat und Fumarat gezogen (Methoden II.1.1.4.). Zu verschiedenen Zeiten des Wachstums wurden Proben anaerob entnommen und der Gehalt an Substraten und ausgeschiedenen Produkten bzw. gaschromatographisch bestimmt (Methoden II.2.2.1. - 7.). Die Zelldichte wurde durch Extinktionsmessung in den entnommenen Proben ermittelt. Dazu wurden Aliquote der jeweiligen Probe abzentrifugiert, die Bakterien über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet und die Gewichte zur Aufstellung einer Eichkurve zwischen Extinktion und Trockengewicht (mg/l) verwendet.

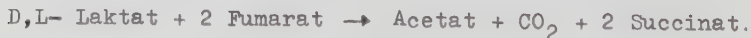
(B): Die Mengen der beim Wachstum verbrauchten Substrate und ausgeschiedenen Endprodukte sind gegeneinander aufgetragen. Als Abszisse wurde Fumarat gewählt, da diese Substrat vollständig verbraucht wird (vgl. A).

(C): Die Mengen an verbrauchtem Laktat (L-Laktat) und an entstandem Acetat sind gegen die zugehörigen Zellmassen während der verschiedenen Zeitpunkte des Wachstums aufgetragen.

○ : Fumarat, □ : L- Laktat, ● : Succinat, ■ : Acetat, + : Zelldichte, ▽ : ΔL-Laktat



Die Steigung für Succinat gegen Fumarat ist eins; das bedeutet, daß Fumarat im gleichen molaren Verhältnis verbraucht wird, wie Succinat entsteht. Die Meßpunkte für D,L- Laktat und Acetat liegen auf einer gemeinsamen Geraden, dh., es wird ebensoviel D,L- Laktat verbraucht wie Acetat entsteht. Die Steigung der Geraden für D,L- Laktat und Acetat ist nur halb so groß wie die Steigung für Succinat. Demnach wird pro Mol ausgeschiedenem Succinat nur ein halbes Mol Acetat ausgeschieden. Die Stöchiometrie der wachstumsunterhaltenden Reaktion lautet daher:



Diese Reaktionsgleichung gilt für die anaerobe Zucht von *E. coli* K12 auf D,L- Laktat und Fumarat bei pH 6.5. Bei diesem pH wird kein Formiat ausgeschieden und für eine vollständige Kohlenstoff- und Wasserstoffbilanz kommt nur CO_2 in Frage. Angesichts der klaren stöchiometrischen Verhältnisse zwischen den anderen Komponenten in der oben aufgeführten Gleichung konnte auf eine quantitative Bestimmung des ausgeschiedenen CO_2 verzichtet werden.

III.7.2. Der molare Wachstumsertrag Y_{Acetat} beim anaeroben Wachstum von *E. coli* K12 auf D,L- Laktat und Fumarat

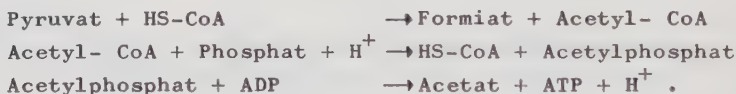
Die Frage nach der Menge an ATP, welche während des Wachstums auf Laktat und Fumarat gebildet wird, läßt sich weitgehend klären, wenn der molare Wachstumsertrag der wachstumsunterhaltenden Reaktion bekannt ist. Dieser Betrag gibt an, wieviel g Zelltrockenmasse pro verbrauchtem Substrat oder pro ausgeschiedenem Endprodukt gebildet wurde. Mit Hilfe dieser Größe läßt sich ermitteln, wieviel ATP pro Mol ausgeschiedenem Substrat während des Wachstums erzeugt wurde, da ein und die selbe Bakterienart stets gleichviel ATP unter anaeroben Bedingungen in der exponentiellen Phase des Wachstums benötigt, um eine definierte Menge an Zellmasse neu zu synthetisieren (35, 36).

Zur Bestimmung des Y_{Acetat} - Wertes beim Wachstum auf Laktat und Fumarat sind in der Figur 6, C die Mengen an gebildetem Acetat bzw. verbrauchtem Laktat gegen die korrespondierenden Zellmassen aufgetragen. Aus der Steigung geht hervor, daß pro Mol Acetat ca. 10 g Zellen (Trockengewicht) gebildet werden. Der molare Wachstumsertrag beim anaeroben Wachstum von *E. coli* K12 auf Laktat und Fumarat ist also $Y_{\text{Acetat}} = 10$.

Aus dem Vergleich dieses Wertes mit dem molaren Wachstumsertrag eines Systems, von welchem man den Stoffwechsel und die genaue Menge an gebildetem ATP pro Mol verbrauchtem bzw. ausgeschiedenem Substrat kennt, läßt sich ermitteln, wieviel ATP beim anaeroben Wachstum auf Laktat und Fumarat zur Bildung von 10 g Trockengewicht Zellmasse benötigt wird.

III.7.3. Der molare Wachstumsertrag Y_{Acetat} bei anaerober Zucht von E. coli K12 auf Pyruvat

Beim anaeroben Wachstum auf Pyruvat entsteht das für die Zellvermehrung notwendige ATP über Substratstufenphosphorylierung aus der Reaktionsfolge

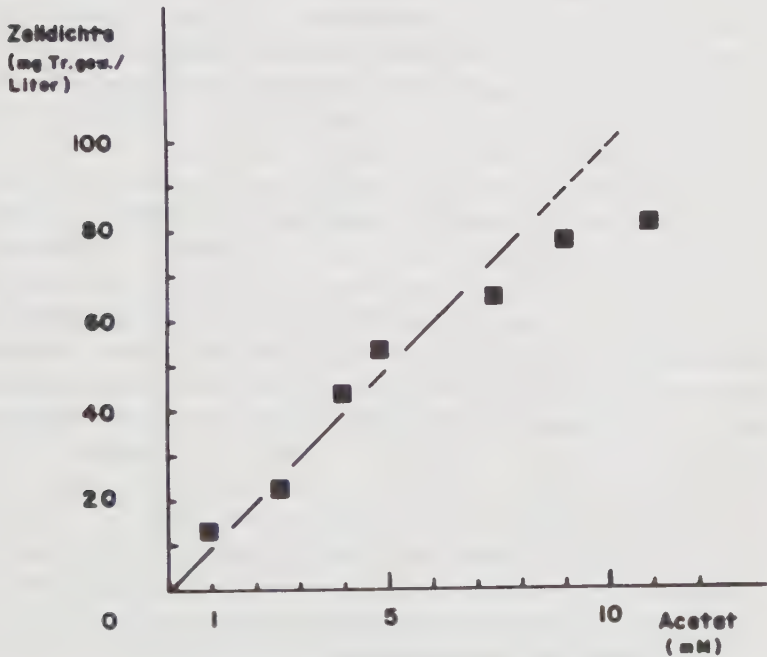


Folglich wird beim anaeroben Abbau des Pyruvats zu Acetat nur ein ATP gebildet. Im Experiment zur Figur 7 wurde E. coli K12 auf Pyruvat gezogen und der molare Wachstumsertrag Y_{Acetat} ermittelt.

Die Gerade durch die Meßpunkte, welche sich während der frühen exponentiellen Phase des Wachstums ergeben, hat die Steigung 1. Das bedeutet, daß beim Wachstum auf Pyruvat genau wie beim Wachstum auf Laktat und Fumarat 10 g Zellen pro Mol ausgeschiedenem Acetat gebildet werden. Da beim Wachstum auf Pyruvat nur 1 ATP gemäß der oben aufgeführten Reaktionsfolge pro entstandenem Acetat gebildet wird, folgt daraus, daß dies beim Wachstum auf Laktat und Fumarat genauso ist. Andernfalls wären die molaren Wachstumserträge Y_{Acetat} für beide Zuchten nicht gleich.

Daraus geht weiter hervor, daß beim Elektronenfluß zum Fumarat kein zusätzliches ATP durch Elektronentransportphosphorylierung gebildet wird und das wachstumsunterhalten-

de ATP bei der Zucht auf Laktat und Fumarat durch Substratstufenphosphorylierung aus dem intermediär entstehenden Pyruvat gewonnen wird.



Figur 7. Ermittlung des molaren Wachstumsertrags Y_{Acetat} bei anaerober Zucht von *E. coli* K12 auf Pyruvat

E. coli K12 wurde anaerob auf Pyruvat gezogen (Methoden II.1.1.4) Proben wurden entnommen und die Substrat- und Endproduktkonzentrationen wie unter Methoden II.2.2.1.-7. und in der Legende zur Figur 6 bestimmt. In Figur 7 sind die Mengen an ausgetragenen Acetat gegen die zugehörigen Zelldichten aufgetragen.

IV. DISKUSSION

IV.1. Die Funktion von Ubichinon

Ubichinon ist in *E. coli* K12 eine obligate Komponente des Elektronentransports von NADH, Succinat, Formiat und Laktat zum Sauerstoff. Durch schonende Behandlung mit Pentan werden beide Chinone bis zu 95 % unter Erhaltung der Enzymaktivität der Proteine aus der Membran entfernt. Dadurch wird die Atmungsaktivität weitgehend gehemmt. Reaktivierung der Atmung wird nur durch den Wiedereinbau von Ubichinon in die Membran erreicht, während der Einbau von Menachinon die Atmung nicht reaktiviert (Tabellen 6 und 7).

Durch Schütteln der trockenen Membranfraktion mit Lösungen von Ubichinon (Q-9, mit 9 Isopreneinheiten in der Seitenkette) in Pentan läßt sich ein natürliches lipophiles Chinon in solchen Mengen in die Membran einbauen, die etwa dem ursprünglichen Gehalt an Ubichinon-8 entsprechen. Durch Beobachtung der Absorption der reaktivierten Membran im Bereich des Ubichinonspektrums läßt sich zeigen, daß das reinkorporierte authentische Ubichinon zum großen Teil durch den Wasserstoff des Substrats reduziert und durch Sauerstoff reoxidiert wird.

Das von Kasket und Brodie erhaltene Resultat (11, 12), wonach nur Succinat Ubichinon-abhängig oxidiert wird, während Menachinon im Weg der NADH-Oxidation beteiligt sei, ist vermutlich auf eine fehlerhafte Methode zurückzuführen. Die Autoren zerstörten die Chinone durch UV-Licht in der Membran und versuchten danach den Elektronentransport durch Zusatz niedriger Homologer des Ubichinons zu der in wässriger Phase suspendierten Membranfraktion zu reaktivieren. Unter diesen Bedingungen ist jedoch nicht sicher, ob das zugesetzte Chinon das zerstörte in der Membran ersetzt. So gelang es den Autoren nicht, die Atmung zu reaktivieren. Daher bestimmten sie die Aktivität der Reduktion von Cytochrom c, in der Annahme, daß diese Aktivität ein Maß für die Atmung sei.

Der Befund von Bragg und Hou (27), daß Ubichinon nur in einem Nebenweg der Atmungskette von *E. coli* beteiligt ist, kommt vermutlich ebenfalls durch eine fehlerhafte Methode zustande. Die Autoren fanden, daß die Extraktion der Membranfraktion mit Isooktan keinen Einfluß auf die Atmung mit NADH hat. Der Gehalt an Ubichinon wurde in den ursprünglichen und den Isooktan-behandelten Partikeln jedoch nicht geprüft. Außerdem wurde nur durch kurzfristiges Schütteln mit dem Kohlenwasserstoff extrahiert, so daß anzunehmen ist, daß von den Autoren nur ein Teil des Ubichinons entfernt wurde. Aber erst die Entfernung von mindestens 90 % des Ubichinons aus der Membran führt zu Hemmungen der Atmung zwischen 80 und 90 %, während die Extraktion von nur 50 % des Ubichinons lediglich zu einer Hemmung von ca. 10 % führt. Dies ist durch den großen Überschuß an Chinonen gegenüber den Dehydrogenasen bedingt (8).

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht das Verhalten einer Mutante von *E. coli*, welche beide Chinone nur auf Zusatz von p-Hydroxybenzoat im Medium synthetisiert (28). Die Reduktion der b-Cytochrome sowie die Atmungsaktivitäten sind in dieser Mutante streng an die Gegenwart der Chinone gebunden.

Ein gleichartiges Ergebnis wurde von Cox et al. (13) erhalten. Die Autoren untersuchten eine Mutante, welche extrem wenig Ubichinon enthielt. In dieser Mutante waren die Atmungsaktivitäten auf 10 - 30 % der Atmungsaktivität des Wildtyps verringert. Dies entspricht zu 90 % extrahierten Membranen beim Wildtyp, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Tabellen 6 und 7).

IV.2. Die Funktion von Menachinon

Menachinon ist in *E. coli* K12 eine Komponente des membrangebundenen Elektronentransports vom NADH zum Fumarat. Dieses Elektronentransportsystem wird beim anaeroben Wachstum auf Laktat und Fumarat zu großer Aktivität induziert und ist unter diesen Bedingungen für den Stoffwechsel essentiell. Fumarat hat dabei die Rolle eines Wasserstoffakzeptors mit hohem Redoxpotential, durch dessen Reduktion die Oxidation des Laktats zu Acetat und die damit verbundene ATP- Synthese durch Substratstufenphosphorylierung energetisch möglich wird. Aus dem Wachstumsertrag bei der Zucht auf Laktat und Fumarat wird geschlossen, daß der Elektronentransport vom NADH bzw. Formiat zum Fumarat nicht mit einer zusätzlichen ATP- Synthese durch Elektronentransportphosphorylierung verbunden ist.

Unter allen anderen untersuchten Zuchtbedingungen wird NADH-Fumaratreduktaseaktivität in wesentlich geringerem Ausmaß gefunden, welches nur eine Rolle dieses Enzymsystems im Baustoffwechsel zuläßt. So wurde von Newton et al. (14) an Mutanten von *E. coli* gezeigt, daß die Fumaratreduktion für die Uracilsynthese unter anaeroben Bedingungen essentiell ist.

Durch die Ausbildung der NADH- Fumaratreduktase in Anpassung an die Zuchtbedingungen unterscheidet sich *E. coli* von *P. rettgeri*. Dieses Bakterium zeigt große Aktivitäten des erwähnten Enzymsystems auch bei Zucht auf komplexem Medium. Außerdem wächst es anaerob auch auf Fumarat allein und der Elektronentransport zum Fumarat liefert ATP (29).

Die membrangebundene Fumaratreduktase spielt auch im anaeroben Stoffwechsel anderer Bakterien eine Rolle. In der Tabelle 10 sind die Aktivitäten der NADH- Fumaratreduktase sowie die Gehalte an Chinonen und b- Cytochromen aus der Literatur zusammengestellt und mit den Werten für *E. coli* verglichen.

Wie *E. coli* enthält auch *P. rettgeri*, welches unter Ausschluß von Sauerstoff gezogen wurde, Ubichinon in beträchtlicher Menge. Entsprechend wird auch stets hohe Atmungsaktivität gefunden (nicht gezeigt, vgl. (5)). *B. megaterium*, ein

Microorganismus	Zuchtbedingungen	Chinongehalt ($\mu\text{Mol} / \text{g Prot.}$) Q MK	Gehalt an b- Cytochrom ($E_{557-575} / 20 \text{ mM}^{-1} / \text{cm}^{-1}$)	Fumaratreduktion ($\mu\text{Mol Fumarat} / \text{g Prot.} / \text{min}$) mit NADH
E. coli K12	D, L- Laktat und Fumarat, anaerob	1.91 3.93	0.39	212
P. rettgeri	Komplex, anaerob	0.13 1.08	0.25	195 (5)
B. megaterium	Komplex, aerob	0 8.10	0.83	140 (4)
Probionibacterium spec. +	Komplex, anaerob	0 a 2.20 a	0.57 a	80 b (a:30) (b:31)
S. faecalis 10C1	Komplex und Fumarat, anaerob	0 c 0.2 c *	0 c, d	40 d (c:33) (d:32)

+ = a:P. pentosaceum, b: P. arabinosum, * = Desmethylmenachinon

Tabelle 10. Chinongehalte, Cytochromgehalte und NADH- Fumaratreduktaseaktivitäten in verschiedenen Bakterien.

obligater Aerobier, zeigt NADH- Fumaratreduktaseaktivität, welche ebenfalls Menachinon- abhängig ist (4). Außerdem wurde NADH- Fumaratreduktase in den Anaerobiern *Propionibacterium* (30, 31) und *S. faecalis* (32, 33) gefunden. Die Beteiligung des vorhandenen Menachinons bzw. Desmethylmenachinons ist aber bislang nicht nachgewiesen.

Für die beiden letztgenannten Bakterien wurde ATP- Synthese durch Elektronentransport zum Fumarat nachgewiesen (33, 34).

Die Beteiligung von Cytochromen an diesem Weg ist bisher in keinem der aufgeführten Fälle eindeutig geklärt. In *S. faecalis* ist sie unwahrscheinlich, da dieses Bakterium meistens kein Cytochrom enthält (35). Andererseits ist die Beteiligung im Weg der Fumaratreduktion die wahrscheinlichste Funktion für das Cytochrom der *Propionibakterien* (30).

Wie in *E. coli* findet sich auch in *P. rettgeri* und *B. megaterium* ein membrangebundenes b- Cytochrom, welches durch Fumarat oxidiert wird (4, 5). Es ist aber bislang nicht entschieden, ob die b- Cytochrome der Atmungskette durch Fumarat oxidiert werden oder ob im Elektronentransportweg zum Fumarat ein eigenes b- Cytochrom vorhanden ist, welches am Elektronentransport zum Sauerstoff nicht teilnimmt.

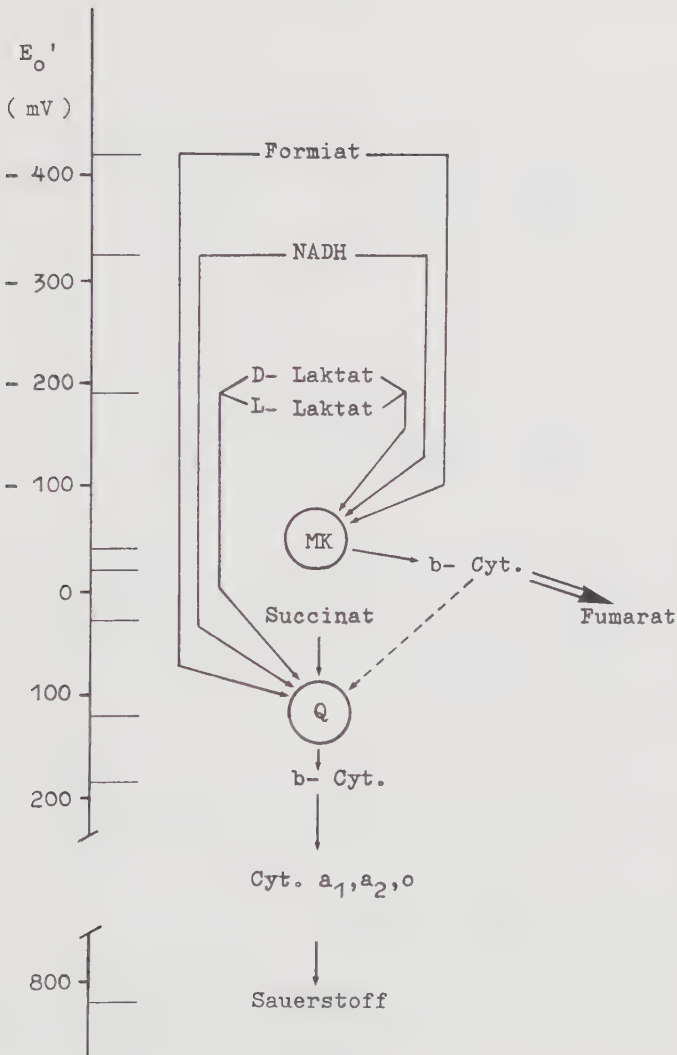
In Schema 1 sind diejenigen Elektronentransportwege in *E. coli* K12 zusammengefaßt, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Einfach ausgezogene Linien bedeuten Elektronentransportwege, über welche die Elektronen im Aeroben und Anaeroben in gleicher Weise fließen.

Die gestrichelte Linie repräsentiert einen aeroben Nebenweg. Dieser Nebenweg wird postuliert, weil Menachinon und das b- Cytochrom im Weg zum Fumarat durch Zugabe von molekularem Sauerstoff reoxidiert werden (vgl. Figur 3).

Die doppelt ausgezogene Linie symbolisiert einen Elektronentransport, welcher in intakten Membranen ausschließlich unter anaeroben Bedingungen stattfindet.

Redoxpotentiale E'_0 : MK - 40 mV, Q 115 mV (5), b- Cytochrom im Elektronentransportweg zum Fumarat - 20 mV (26).



Schema 1. Elektronentransportwege in *E. coli* K12

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Chinone von *E. coli* K12 sind in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert. Nach Zellaufschluß mit Ampicillin, Lysozym oder Ultraschall werden beide Chinone durch Fraktionierung des Homogenats zusammen mit der Atmungsaktivität und den membrangebundenen Cytochromen angereichert.
2. Ubichinon ist in *E. coli* K12 eine essentielle Komponente des Elektronentransports zum Sauerstoff. Die Extraktion beider Chinone (Ubichinon und Menachinon) aus der Membran durch Pentan führt zur Hemmung der Atmung mit NADH, Formiat, Succinat und Laktat. Die Atmungsaktivitäten werden durch Reinkorporation von Ubichinon in die Membran wiederhergestellt, aber nicht durch Menachinon.
3. Menachinon ist in *E. coli* K12 für den Elektronentransport zum Fumarat notwendig. Bei der Extraktion beider Chinone aus der Membran durch Pentan wird der Elektronenfluß zum Fumarat gehemmt. Durch Reinkorporation von Menachinon läßt er sich wieder herstellen, nicht jedoch durch Reinkorporation von Ubichinon.
4. Der Gehalt der Chinone hängt von den Zuchtbedingungen ab. Bei maximaler Sauerstoffversorgung wird Ubichinon in zehnfachem Überschuß gegenüber Menachinon gebildet. Unter diesen Zuchtbedingungen ist die Kohlenstoffquelle unbedeutend, auf der die Bakterien gezogen werden.
5. Bei anaerober Zucht auf C_3 - Substraten oder auf Glucose und Bicarbonat wird viermal soviel Menachinon gebildet wie Ubichinon. Unter allen anderen untersuchten Zuchtbedingungen liegt das Verhältnis der Chinongehalte zwischen den unter 4. und 5. genannten Extremwerten.
6. Unter anaeroben Bedingungen wächst *E. coli* K12 auf einem Mineralmedium mit Laktat und Fumarat als einzigen Kohlen-

stoffquellen. Die Zellvermehrung wird bei pH 6.5 durch folgende Reaktion unterhalten:



Der molare Wachstumsertrag ist 10 g Zelltrockengewicht/Mol Acetat. Der gleiche Wert wird bei anaerober Zucht auf Pyruvat gefunden, welches die Zellvermehrung durch folgende Reaktion ermöglicht:



Daraus wird geschlossen, daß in der Reaktion (a) nur 1 Mol ATP durch Substratstufenphosphorylierung gewonnen wird und eine zusätzliche Bildung von ATP oder energiereichen Verbindungen nicht stattfindet.

7. Die zwischen 240 nm und 300 nm mit dem Zweiwellenlängenphotometer beobachteten Absorptionsänderungen entsprechen den Redoxreaktionen der Chinone. Im anaeroben Zustand mit Formiat sind beide Chinone nahezu völlig reduziert; im stationären Zustand der Atmung sind beide Chinone nur teilweise reduziert und im stationären Zustand der Fumaratreduktion ist Ubichinon völlig reduziert, Menachinon dagegen nur teilweise. Dieses Ergebnis bestätigt die ausschließliche Beteiligung von Menachinon am Elektronentransport zum Fumarat.
8. Durch spektrophotometrische Analyse der Membranfraktion von anaerob auf Laktat und Fumarat gezogenem E. coli K12 wird ein b-Cytochrom gefunden, welches durch NADH und Formiat reduziert wird und in stationären Zustand der Fumaratreduktion weitgehend oxidiert ist.

VI. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Akz	Akzeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BVH	Benzylviologen (reduziert)
CoA	Coenzym A
DNase	Desoxyribonuclease
Don	Donor
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
For	Formiat
D- Lac	D- Laktat
D,L- Lac	D,L- Laktat
MB	Methylenblau
MK	Menachinon
MK- 7	Menachinon mit 7 Isopreneinheiten
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
Q	Ubichinon
Q- 9	Ubichinon mit 9 Isopreneinheiten
Succ	Succinat
Tris	Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Smith, L. in
 "Biological Oxidations", S. 89
 Hrsg. T. P. Singer
 Verlag Interscience, New York (1968)

- (2) Hempfling, W. P.
 Biochem. Biophys. Res. Com. 41, 9 (1970)

- (3) John, P. und Whatley, F. R.
 Biochem. Biophys. Acta 216, 342 (1970)

- (4) Kröger, A. und Dadak, V.
 Eur. J. Biochem. 11, 328 (1969)

- (5) Kröger, A., Dadak, V., Klingenberg, M., und Diemer, F.
 Eur. J. Biochem. 21, 322 (1971)

- (6) Itagaki, E.
 J. Biochem. 55, 432 (1964)

- (7) Klingenberg, M. in
 "Biological Oxidations", S. 7
 Hrsg. T. P. Singer
 Verlag Interscience, New York 1968

- (8) Kröger, A. und Klingenberg, M.
 Vitamins and Hormones 28, 533 (1970)

- (9) Gray, C. T., Wimpenny, J. W. T., Hughes, D. E. und
 Mossman, M.
 Biochem. Biophys. Acta 117, 22 (1966)

- (10) Smith, L. in
 "Biological Oxidations", S. 75

Hrsg. T. P. Singer

Verlag Interscience, New York (1968)

- (11) Kashket, E. R. und Brodie, A. F.
Biochem. Biophys. Acta 78, 53 (1963)
- (12) Kashket, E. R. und Brodie, A. F.
J. Biol. Chem. 238, 2564 (1963)
- (13) Cox, G. B., Newton, N. A., Gibson, F., Snoswell, A.M.,
und Hamilton, J. A.
Biochem. J. 117, 551 (1970)
- (14) Newton, N. A., Cox, G. B. und Gibson, F.
Biochem. Biophys. Acta 244, 155 (1971)
- (15) Davis, B. D. und Mingioli, E. S.
J. Bacteriol. 60, 17 (1950)
- (16) Bartsch, R. G. und Kamen, M.
J. Biol. Chem. 230, 41 (1958)
- (17) Ernster, L., Lee, I.-Y., Norling, B. und Persson, B.
Eur. J. Biochem. 9, 299 (1969)
- (18) Schoner, W. in
"Methoden der enzymatischen Analyse", S. 1551
Hrsg. H. U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)
- (19) Singer, T. P., Bernath, P. und Lusty, C. J. in
"Methoden der enzymatischen Analyse", S. 1573
Hrsg. H. U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)

- (20) Bernath, P. und Singer, T. P. in
"Methods of Enzymology", V, S. 597
Hrsg. S. P. Colowick und N. O. Kaplan
Verlag Academic Press, New York (1962)
- (21) Gawehn, K. und Bergmeyer, H. U. in
"Methoden der enzymatischen Analyse", S. 1450
Hrsg. H. U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)
- (22) Hohorst, H.-J. in
"Methoden der enzymatischen Analyse", S. 1425
Hrsg. H. U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)
- (23) Czok, R. und Maprecht, W. in
"Methoden der enzymatischen Analyse", S. 1407
Hrsg. H. U. Bergmeyer
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970)
- (24) Szarkowska, L. und Klingenberg, M.
Biochem. Z. 338, 674 (1963)
- (25) Quastel, R., Stephenson, W. und Whetham, R.
Biochem. J. 19, 304 (1925)
- (26) Fujita, F., Itagaki, E. und Sato, R.
J. Biochem. 53, 282 (1963)
- (27) Bragg, P. D. und Hou, C.
Arch. Biochem. Biophys. 119, 194 (1967)
- (28) Jones, R. G. W.
Biochem J. 103, 714 (1967)
- (29) Kröger, A.
Z. Physiol. Chem. 354, 222 (1973)

- (30) Kröger, A.
unveröffentlicht

- (31) Sone, N.
J. Biochem. 71, 931 (1972)

- (32) Baum, R. H. und Dolin, M. J.
J. Biol. Chem. 240, 3425 (1965)

- (33) Faust, P. J. und Van Demark, P. J.
Arch. Biochem. Biophys. 137, 393 (1970)

- (34) Bauchop, T. und Elsdon, S. R.
J. gen. Microbiol. 23, 457 (1960)

- (35) Stouthammer, A. H. und Bettenhausen, C.
Biochem. Biophys. Acta 301, 53 (1973)

- (36) Decker, K., Jungermann, K. und Thauer, R. K.
Angew. Chemie 82, 153 (1970)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich für die vorbehaltlose Förderung bedanken, die mein verehrter Lehrer Achim Kröger mir zuteil werden ließ. Dem Arbeitskreis um Professor Dr. Klingenberg danke ich für Kritik und Anregung an dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 13. 1. 1946 wurde ich, Horst Schaefer, als Sohn des Ingenieurs Ernst Schaefer und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Niemeyer, in Hannover geboren. Im Jahre 1948 zogen meine Eltern nach Laudenbach an der Bergstraße, wo ich bis 1954 die Volksschule besuchte. Von dort zogen wir nach Aalen, wo ich weiter die Volksschule und bis 1966 das dortige Schubart-Gymnasium besuchte. Mit Erhalt der Hochschulreife begann ich an der Universität München das Studium der Biologie. 1968 legte ich die Diplomvorprüfung, 1970 die Diplomhauptprüfung ab. Die Diplomarbeit habe ich bis April 1971 am Institut für Genetik an der Universität München fertiggestellt. Danach habe ich unter Anleitung von PD Dr. rer. nat. Achim Kröger im Arbeitskreis von Prof. Klingenberg am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München die vorliegende Doktorarbeit angefertigt.

